

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Ekologie



**Bc. Markéta Macholdová**

**Indukce extracelulárních fosfatáz acidotolerantních planktonních  
řas z rodu *Coccomyxa*: vliv koncentrace a formy fosforu**

**Induction of extracellular phosphatases in acidotolerant planktonic algae  
from the genus *Coccomyxa*: impact of phosphorus concentration and form**

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Linda Nedbalová, Ph.D.

Praha, 2016



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. 5. 2016

Podpis

## **Poděkování**

Především děkuji mé školitelce RNDr. Lindě Nedbalové Ph.D., která mě přivedla k tomuto zajímavému tématu a poskytla mi mnoho cenných rad při vzniku textu i při práci v laboratoři a v terénu. Děkuji za její vstřícný, osobní, ale zároveň profesionální přístup, díky kterému se mi s ní velmi příjemně spolupracovalo.

Za poskytnutí veškerých znalostí o metodice FLEA, plně vybavené laboratoře a za korekturu (nejen) metodické části textu děkuji prof. RNDr. Jaroslavu Vrbovi Ph.D. a také RNDr. Jiřímu Nedomovi CSc. z Hydrobiologického ústavu Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích. Velmi si vážím jejich zájmu o moji práci a nadšené podpory, která pro mě byla po celou dobu velkou motivací.

Dále bych chtěla poděkovat paní Janě Vokurkové st. z Katedry ekologie, která mi v mnohém usnadnila moji laboratorní práci, moc pěkně se o mě starala a vždy mi dodala dobrou náladu.

Na závěr patří obrovský dík mým rodičům za jejich láskyplnou péči a materiální podporu během celého mého studia i dosavadního života. Děkuji také sestře Kateřině a všem blízkým přátelům z fakulty, díky kterým bylo mé studium velkým zážitkem.

## Abstrakt

Fosfor je častým limitujícím prvkem pro fytoplankton ve sladkovodních ekosystémech, protože řasy a sinice jsou schopné ho přijímat pouze v rozpuštěné anorganické formě. Fytoplankton má několik mechanismů, pomocí kterých umí nedostatek fosforu překonávat. Jedním z nich je produkce extracelulárních fosfatáz. Tyto enzymy jsou vylučovány na povrchu buněk nebo uvolňovány do jejich okolí a hydrolyzují organické molekuly obsahující fosfor. Uvolněný anorganický fosfor může být následně přijímán buňkami. Tento mechanismus může zásadně ovlivnit konkurenceschopnost některých druhů řas v prostředí s dlouhodobou limitací fosforem (např. působením nízkého pH na dostupnost fosforu).

V této práci byl v laboratorních podmínkách zkoumán vliv koncentrace a formy fosforu na extracelulární fosfatázovou aktivitu kmenů rodu *Coccomyxa* (Chlorophyta), které byly izolované ze dvou acidifikovaných lokalit s různou dostupností fosforu – Plešného jezera a Hromnického jezírka. Extracelulární fosfatázová aktivita byla vyhodnocena na úrovni jednotlivých buněk pomocí metody FLEA a fluorescenční mikroskopie. Metoda FLEA umožňuje pomocí umělého substrátu ELF<sup>®</sup>97 fosfátu zobrazit fosfatázově aktivní místa na povrchu buněk.

Extracelulární fosfatázová aktivita byla indukována kultivací v médiích s anorganickou i organickou formou fosforu. Experimenty prokázaly vliv koncentrace i formy fosforu na fosfatázovou aktivitu, která byla ve všech kulturách vyšší se snižováním koncentrace fosforu v médiu a při kultivaci v médiu s organickou formou fosforu. Buňky v rámci jedné populace se lišily ve své fosfatázové aktivitě. Porovnání dvou testovaných kmenů ukázalo, že jejich fosfatázová aktivita je nezávislá na lokalitě, ze které byly izolovány. Schopnost kmenů z rodu *Coccomyxa* produkovat extracelulární fosfatázy spolu s tolerancí k nízkému pH a toxicitě kovů umožňuje jejich dominanci ve fytoplanktonu Plešného jezera a Hromnického jezírka.

**Klíčová slova:** *Coccomyxa*, limitace fosforem, extracelulární fosfatázová aktivita, metoda FLEA, ELF<sup>®</sup>97 fosfát, acidifikovaná jezera, Plešné jezero, Hromnické jezírko.

## Abstract

Phosphorus is frequently a limiting factor for phytoplankton in freshwater ecosystems, because algae and cyanobacteria are able to incorporate it only in a dissolved inorganic form. Phytoplankton evolved several mechanisms to overcome phosphorus limitation. One of them is the production of extracellular phosphatases. These enzymes are excreted on the surface of cells or released to the environment. They hydrolyze organic molecules containing phosphorus, which can be then incorporated by cells. This mechanism can influence the competitiveness of algae living in environments that are characterised by long-term phosphorus limitation (that is caused e.g. by the effect of low pH).

In this study the influence of phosphorus concentration and form on extracellular phosphatase activity under laboratory conditions was investigated. The two experimental strains of the genus *Coccomyxa* (Chlorophyta) were isolated from acidified localities with different phosphorus availability – Plešné Lake and Hromnické Lake. Extracellular phosphatase activity on a single-cell level was measured using the FLEA technique and fluorescence microscopy. The FLEA technique allows direct visualization of phosphatases on the cell surface by incubating the samples with the artificial substrate ELF<sup>®</sup>97 phosphate.

Extracellular phosphatase activity in cultures was induced by cultivation in media both with organic and inorganic phosphorus. Experiments showed the influence of phosphorus concentration and form on extracellular phosphatase activity, which was higher in the phosphorus limited cultures and also in samples cultivated in media with organic form of phosphorus. Cells within one population differed in their phosphatase activity. Comparison of the two strains showed that their extracellular phosphatase activity was independent on the locality from which the strain was isolated. The ability to produce extracellular phosphatases together with low pH and metal tolerance enabled the dominance of the genus *Coccomyxa* in the phytoplankton of Plešné Lake and Hromnické Lake.

**Key words:** *Coccomyxa*, phosphorus limitation, extracellular phosphatase activity, FLEA technique, ELF<sup>®</sup>97 phosphate, acidified lakes, Plešné Lake, Hromnické Lake.

## Obsah

<b>1.</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>Literární přehled.....</b>	<b>11</b>
2.1.	Fosfor ve sladkovodních ekosystémech.....	11
2.2.	Acidifikace sladkovodních ekosystémů.....	12
2.2.1.	Kyselá atmosférická depozice .....	12
2.2.2.	Acid mine drainage (AMD) .....	14
2.2.3.	Vliv pH na dostupnost fosforu .....	14
2.2.4.	Vliv nízkého pH na druhové složení a biomasu fytoplanktonu .....	16
2.3.	Extracelulární fosfatázy .....	17
2.3.1.	Charakteristika fosfatáz .....	18
2.3.2.	Další mikrobiální enzymy .....	19
2.3.3.	Aktivita extracelulárních fosfatáz ve sladkovodním prostředí.....	19
2.3.4.	Metody stanovení fosfatázové aktivity.....	23
2.4.	Taxonomické postavení a ekologie rodu <i>Coccomyxa</i> (Chlorophyta) .....	24
<b>3.</b>	<b>Cíle a hypotézy.....</b>	<b>26</b>
<b>4.</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>27</b>
4.1.	Odběrové lokality.....	27
4.1.1.	Plešné jezero.....	27
4.1.2.	Hromnické jezírko .....	28
4.2.	Kultivace řas .....	29
4.3.	Stanovení fosfatázové aktivity .....	31
4.3.1.	Inkubace s ELFP .....	31
4.3.2.	Analýza obrazu.....	32
4.4.	Použité statistické metody a programy .....	34
<b>5.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>35</b>
5.1.	Časový průběh fosfatázové aktivity <i>Coccomyxa</i> sp. při inkubaci s ELFP.....	35
5.2.	Koncentrace SRP ve vzorcích kultur <i>Coccomyxa</i> sp. ....	36
5.3.	Závislost extracelulární fosfatázové aktivity na koncentraci a formě fosforu .....	38
5.3.1.	Kultivace v médiích s různou koncentrací anorganického fosforu .....	38
5.3.2.	Kultivace v médiích s různou koncentrací $\beta$ -glycerol fosfátu.....	39
5.3.3.	Celkové vyhodnocení extracelulární fosfatázové aktivity v kulturách <i>Coccomyxa</i> sp.....	40
5.3.4.	Kultivace v médiích bez fosforu .....	45
<b>6.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>46</b>
6.1.	Extracelulární fosfatázová aktivita u řas rodu <i>Coccomyxa</i> dominujících v planktonu Plešného jezera a Hromnického jezírka .....	46

6.2.	Vliv koncentrace a formy fosforu na extracelulární fosfatázovou aktivitu (v přírodním prostředí i v laboratorních experimentech).....	49
6.3.	Měření extracelulární fosfatázové aktivity na úrovni jednotlivých buněk pomocí metody FLEA .....	52
6.4.	Význam extracelulární fosfatázové aktivity ve sladkovodním prostředí .....	53
<b>7.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>56</b>
<b>8.</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>58</b>
<b>9.</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>72</b>



## 1. Úvod

Acidifikace sladkovodních ekosystémů je složitý a komplexní proces, který způsobuje rozsáhlé změny týkající se chemického složení i biologické struktury původního ekosystému (Schindler 1988, 1994). Nízké pH ve vodním ekosystému přináší mnoho problémů, které musí sladkovodní organismy překonávat. Patří mezi ně například omezení dostupnosti některých živin či zvýšená koncentrace těžkých kovů (Gross, 2000).

Produktivita sladkovodních ekosystémů je obvykle dána dostupností fosforu (Schindler 1977). Jakékoli vnitřní či vnější omezení jeho dostupnosti pro fytoplankton, způsobuje snížení produktivity daného ekosystému. Primární producenti, tedy řasy a sinice, mohou přijímat fosfor pouze ve formě rozpuštěných ortofosfátů (SRP) (Cotner a Wetzel; 1992; Hernández et al., 1996). Výsledky experimentů dokazují vliv acidifikace vody i půdy na cyklus fosforu díky zvýšenému zadržování fosforu v sedimentech či srážení sloučenin fosforu s hliníkem či železem ve vodním prostředí (např. Almer et al. 1978; Broberg 1984; Jansson et al. 1986; Kopáček et al., 2000).

Nedostatek fosforu může vést u fytoplanktonních organismů k metabolickým poruchám jako je například pokles fotosyntézy a respirace, zastavení růstu a dokonce i buněčné smrti (Lapointe, 1987; Theodorou et al., 1991; Gárciá-Sánchez et al., 1996).

Extracelulární fosfatázy jsou produkovány fytoplanktonem při nedostatku SRP, enzym je syntetizován a uvolněn do okolí buňky (Jansson et al., 1988). V prostředí s nízkým pH jsou tyto fosfatázy označovány jako kyselé fosfatázy (acidic phosphatases, AcP), podle jejich funkčního optima (Vincent et al., 1992).

Acidifikované lokality vznikají přirozeně i antropogenně. Obvykle je vodní prostředí okyseleno v důsledku reakce vody s podložím. Většina extrémně kyselých lokalit ale vzniká v důsledku přímého či nepřímého působení člověka. Jedná se především o těžební oblasti, kde dochází v opuštěných povrchových (ale i podzemních) dolech k fenoménu tzv. acid mine drainage (AMD). Nemalý vliv na okyselování prostředí mají samozřejmě také kyselé srážky (Johnson, 1998).

Příkladem acidifikované lokality v České republice je Plešné jezero na Šumavě, které se postupně zotavuje z následků atmosférické acidifikace a Hromnické jezírko na Plzeňsku, kde dochází k AMD. Jezera se liší koncentrací fosforu - v Plešném jezeru je výrazně snížená dostupnost fosforu ( $\text{SRP} < 1 \mu\text{g l}^{-1}$ ), naopak v Hromnickém jezírku je fosforu dostatek ( $\text{SRP}$  až  $1,6 \text{ mg l}^{-1}$ ). V obou jezerech dominuje fytoplanktonu jednobuněčná zelená řasa *Coccomyxa*

sp. (Trebouxiophyceae) (Nedbalová et al., 2006; Hrdinka et al., 2013). Tento druh je schopen růst v extrémních podmínkách, takže je vhodným organismem ke kultivaci (Sládečková, 1959).

Aktivita kyselých fosfatáz (acidic phosphatase activity, AcPA) je zajímavým ekologickým ukazatelem chemického a biologického statusu studované lokality a zároveň důležitou ekofyziologickou adaptací. V minulosti byly studovány rozdíly ve fosfatázové aktivitě u různých druhů řas i procesy ovlivňující jejich produkci (např. Nedoma et al., 2003; Štrojsová et al., 2005).

Chybí ovšem laboratorní experimenty, které by pomohly objasnit, za jakých podmínek dochází k indukci produkce kyselých fosfatáz na buněčné úrovni. Dosavadní práce, zabývající se aktivitou extracelulárních fosfatáz na úrovni jednotlivých buněk, zkoumaly převážně přírodní vzorky (např. Štrojsová et al., 2003, 2005, 2008). Zkoumání faktorů působících na produkci fosfatáz za kontrolovaných podmínek nebylo, pokud je mi známo, nikdy provedeno. Kmeny z rodu *Coccomyxa* izolované z kyselých jezer jsou vhodnými organismy, na kterých lze testovat produkci extracelulárních fosfatáz za různých podmínek.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Fosfor ve sladkovodních ekosystémech

Fosfor hraje důležitou roli při různých biologických procesech a přitom je ho ve vodních ekosystémech poměrně malé množství. Je součástí mnoha molekul (DNA, RNA, ADP, ATP, NADPH, fosfoproteiny, fosfolipidy, atd.), a proto je pro organismy nepostradatelný. Fosfor je v jezerech přítomný v několika chemických formách, které můžeme dělit na organické a anorganické a dále na rozpuštěné, koloidní a partikulované. V organických molekulách je fosfor buď přímo vázán na atom uhlíku (C–P) a tvoří fosfonáty (např. fosfonoproteiny, fosfonolipidy, fosfonoglykolipidy) nebo je vázán pomocí esterové vazby (C–O–P) a tvoří fosfomonoestery (např. ATP), fosfodiesteru (např. nukleové kyseliny, fosfolipidy) a fosfotriestery. Partikulovaný organický fosfor se vyskytuje v podobě živých či mrtvých buněk, partikulovaný anorganický fosfor jako fosfát ve vazbě nejčastěji s železem, vápníkem nebo hliníkem. Koloidní (nebo také vysrážený) organický fosfor najdeme například ve formě ATP, fosfonátů apod., koloidní anorganický fosfor ve formě pyro-, meta- a polyfosfátů. Dále se fosfor také vyskytuje v různých variantách jako rozpuštěný organický fosfor (dissolved organic phosphorus, DOP). Nejdůležitější formou v jezerech je ovšem rozpuštěný anorganický fosfor (dissolved inorganic phosphorus, DIP) a ortofosfáty ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), díky své dostupnosti pro fytoplankton. Standardní chemické metody toto rozdělení nenásledují, rozlišují pouze rozpuštěné a partikulované formy fosforu podle jejich reaktivity při kyselé hydrolýze. Běžně se stanovuje celkový fosfor (total phosphorus, TP), celkový rozpuštěný fosfor (total dissolved phosphorus, TDP) a rozpustný reaktivní fosfor (soluble reactive phosphorus, SRP). SRP je označován za reaktivní, protože zahrnuje převážně rozpuštěné anorganické ortofosfáty (Boström et al., 1988; Jansson et al., 1988; Diaz-de-Quijano, 2014).

Geochemický cyklus fosforu v přírodě se vyznačuje tím, že v atmosféře neexistuje žádný zásobník fosforu, ze kterého by primární producenti mohli čerpat. Fosfor se do jezer dostává z vnějšího prostředí vyluhováním z podloží a pomocí přítoku, splachu a srážek v různých podobách (Schindler, 1977). Jelikož je tedy zásobník fosforu chudý, musí být fosfor v jezerech účinně recyklován. Partikulovaný fosfor, který se do jezer dostal z vnějšího prostředí, je v epilimniu pomocí zooplanktonu a fytoplanktonu uvolňován jako DOP. DOP je hydrolyzován (anorganicky, enzymaticky nebo kombinace obojího) na DIP (ortofosfáty),

který je ihned inkorporován do buněk fytoplanktonu a bakterioplanktonu jako jediná dostupná forma. Zbývající partikulovaný či koloidní fosfor se dostává do hypolimnia. Zpět do vodního sloupce se může dostat pomocí míchání, uvolněním ze sedimentů nebo z vnějších zdrojů, což ale může trvat velmi dlouhou dobu. Fosfor se tedy může stát limitujícím prvkem, jelikož podloží je většinou na fosfor chudé a dostupnost fosforu je dána schopností planktonních organismů recyklovat DOP a hydrolyzovat DOP na DIP (Francko a Heath, 1979; Ammerman, 1993; Wetzel, 2001).

## **2.2. Acidifikace sladkovodních ekosystémů**

Ve sladkovodních ekosystémech s nízkým pH dochází ke změnám ve složení, početnosti a produktivitě organismů na všech úrovních. K okyselení vodních těles dochází přirozeně, ale i antropogenně. Zdrojem nízkého pH prostředí jsou různé geochemické a biologické procesy. Přirozeně kyselé jsou oblasti vulkanické činnosti s geotermálními prameny nebo rašeliniště. Většina okyselených lokalit ale vzniká v důsledku přímého či nepřímého působení člověka. Jedná se především o oblasti ovlivněné kyselou atmosférickou depozicí a těžební oblasti, kde v opuštěných dolech dochází k fenoménu tzv. acid mine drainage (AMD) (Hendrey et al., 1976; Schindler, 1994; Johnson, 1998; Driscoll, 2001).

### **2.2.1. Kyselá atmosférická depozice**

Problému okyselování sladkých vod začala být věnována pozornost až v 70. letech 20. století a od té doby bylo věnováno této oblasti nemalé vědecké, ekonomické i politické úsilí (Schindler, 1988). V důsledku průmyslové a zemědělské činnosti se do atmosféry se dostávají ve zvýšené míře emise. Jsou to převážně oxidy síry ( $\text{SO}_2$ ) a dusíku ( $\text{NO}_x$ ). Z emisí se v atmosféře stávají sírany ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) a dusičnany ( $\text{NO}_3^-$ ), které se ve vodním prostředí rychle transformují na kyseliny a jsou hlavním zdrojem nízkého pH srážkové vody (Driscoll, 2001). Dříve se udávalo, že za tzv. kyselý je déšť považován pod pH 5,6, což je pH destilované vody nasycené  $\text{CO}_2$ . Normální dešťové srážky jsou také mírně kyselé, protože voda v atmosféře v malé míře reaguje s atmosférickým  $\text{CO}_2$  za vzniku slabé kyseliny uhličitě. Mnohé oblasti ale mají pH srážek mnohem nižší než pH 5. Polutanty mohou být atmosféricky unášeny několik stovek kilometrů a zasáhnout tak i oblasti velmi vzdálené od zdroje (Schindler, 1988). Kyselé srážky vstupují do sladkovodních ekosystémů přímo nebo skrz povodí. Když má voda nízkou

neutralizační kapacitu nebo povodí obsahuje půdy chudé na zásadité látky, prostředí se okyselí. Okyselování vody vyrovnávají pufrací systémy (nejvíce uhličitanový, hliníkový, železitý, doplněné o další ionty) a když jsou přílišným přísunem vodíkových iontů vyčerpány, začíná docházet k okyselování vody a dalším souvisejícím změnám v chemismu a oživení lokalit (Geller et al., 1998).

K nejzávažnějším změnám v chemismu vody v důsledku snižování pH je zvýšená koncentrace kovů (Fe, Al, As, Cu, Zn, Mn, Cd, Pb) a omezení dostupnosti fosforu (Schindler et al., 1980; Kopáček et al., 2001; Nixdorf et al., 2001). Především přítomnost zvýšené koncentrace hlinitých iontů má negativní dopad na mnoho vodních organismů. Hliník je obsažen v mnoha horninách, při zvětrávání se ukládá do půdy navázáním na organické látky. V povodí s nízkou neutralizační kapacitou jsou v důsledku zvýšené koncentrace vodíkových iontů hlinité ionty z podloží vyplavovány. V pH větším než 5 je hliník vázán v komplexech, při nižším pH se ovšem hliník vyskytuje převážně jako monomerní  $\text{Al}^{3+}$ . Vysoká koncentrace  $\text{Al}^{3+}$  je toxická pro mnoho organismů, především pro mnoho druhů ryb, které mají dýchací problémy a hynou (Driscoll, 1985).

V důsledku poklesu pH vody se mění druhové složení sladkovodní flory a fauny a citlivé organismy z oblastí zcela mizí. Počet druhů fytoplanktonu a zooplanktonu se při nízkém pH výrazně snižuje. Mnoho rybích druhů je citlivých k acidifikaci a pod určitou hodnotou pH není schopno přežít, patří mezi ně například plotice (*Leuciscus rutilus*), okoun (*Perca fluviatilis*), štika (*Esox lucius*), střevle (*Phoxinus phoxinus*) a pstruh (*Salmo trutta*) (Almer et al., 1974).

Zotavení ekosystému z acidifikace je možné po omezení přísunu polutantů. Doba chemického zotavení závisí na míře poklesu atmosférické depozice, schopnosti prostředí doplnit zásadité kationty, rychlosti zvětrávání a dalších aspektech dané lokality. Zotavení bioty zaostává za chemickým zotavením ekosystému (Driscoll, 2001; Vrba et al., 2003; Nedbalová et al., 2006).

Povodí, jezera a toky se mohou stát citlivé k acidifikaci z různých důvodů. Závisí především na vlastnostech podloží. V Evropě se oblasti citlivé k acidifikaci nacházejí ve Skandinávii a Anglii, ale také v Nizozemí, Belgii, Dánsku, Švýcarsku, Itálii, Německu a Irsku. Ve Spojených státech amerických se nacházejí rozsáhlé oblasti citlivé k acidifikaci v Minnesotě, Wisconsinu, severním Michiganu, několik oblastí na jihovýchodě, hornaté oblasti na západě a téměř celá severovýchodní oblast země, včetně východní části Kanady. Rozsáhlé oblasti se nacházejí také v Asii, Africe a jižní Americe (Driscoll, 1985).

### 2.2.2. Acid mine drainage (AMD)

Acid mine drainage (AMD) je jev spojený s těžbou nerostných surovin. S těžbou kovových rud či uhlí se na povrch důlních jam dostává také zvýšené množství materiálu obsahujícího sulfidy (nejčastěji pyrit -  $\text{FeS}_2$ ). Stykem s vodou (zaplavení nebo vlhké klima) a kyslíkem (z atmosféry nebo chemických zdrojů) dochází k oxidaci sulfidů a okyselování lokality (až pH 3). I když tyto procesy probíhají v přírodě přirozeně, těžba způsobuje akumulaci minerálů obsahujících síru na povrchu důlních jam a urychluje následné okyselování zaplavených lokalit. Ve většině případů k okyselování lokalit přispívají ještě chemolitotrofní bakterie (např. *Acidithiobacillus ferrooxidans*), které celý proces mnohonásobně urychlují. Oxidované sulfidy obsahují například měď, olovo, zinek a vůbec nejčastěji železo. Typická je tedy pro tyto lokality následně zvýšená koncentrace těžkých kovů. Vymýváním a průsakem se mohou sloučeniny vzniklé v AMD šířit i do přilehlých toků (Johnson, 1998; Akcil a Koldas, 2006; Novis a Harding, 2007).

Každá lokalita ovlivněná AMD má unikátní vlastnosti a nelze spolehlivě předpovědět míru okyselování. Záleží na mnoha faktorech, patří mezi ně pH, teplota, koncentrace kyslíku ve vodě, stupeň nasycení vzduchu vodou, chemická aktivita  $\text{Fe}^{3+}$ , povrch sulfidu vystaveného reakcím, chemická aktivační energie potřebná k zahájení reakce a bakteriální aktivita (Akcil a Koldas, 2006).

Jezera s AMD vznikají na místech po těžbě hnědého uhlí, černého uhlí a kovových rud. Tyto lokality se nacházejí po celém světě, nejvíce v západní Austrálii (uhelná pánev v Collie), severní Americe (oblast Cedar Creek v Missouri) a Evropě (pyritový pás v jihozápadním Španělsku a uhelná pánev v oblasti bývalé Lužice v Německu a Polsku) (Geller et al., 2012).

### 2.2.3. Vliv pH na dostupnost fosforu

Proces acidifikace ve sladkovodních ekosystémech způsobený kyselou atmosférickou depozicí je doprovázen oligotrofizací jezer, protože je přísun prvků a zejména fosforu z povodí omezen. Z důvodu zvýšené koncentrace hliníkových iontů v prostředí dochází k omezení dostupnosti fosforu pro fytoplankton, snižuje se jeho primární produkce a nárůst biomasy nedosahuje stejné rychlosti jako při dostačující koncentraci fosforu (Olsson a Pettersson, 1993). Příkladem atmosféricky acidifikované lokality, kde sloučeniny hliníku omezují dostupnost fosforu, je Plešné jezero na Šumavě. Vysoká míra kyselé depozice a

nasycení sloučeninami dusíku způsobily zvýšený přísun hliníkových iontů, síranů a dusičnanů do jezera. Biologická redukce dusičnanů a síranů ve vodním sloupci přispěla ke zvýšení alkality v jezeru (především v hypolimniu). Čím větší je přísun dusičnanů a síranů do jezera, tím více se zvyšuje alkalita jezera a tím větší je rozdíl v pH vody ve srovnání s přítokem z okolí, tudíž se zvyšuje riziko tvorby koloidních hydroxidů hliníku ve vodním sloupci. Srážení hliníku má několik efektů na dostupnost fosforu v jezeře. Ukládání sraženin s hliníkem způsobuje zvětšování horní vrstvy sedimentu na dně jezera (oproti vrstvám sedimentu z doby před acidifikací jezera) a tím se zvyšuje kapacita zadržování fosforu v sedimentu. Zvýšená koncentrace koloidních hydroxidů hliníku nad sedimentem způsobuje opětovnou vazbu ortofosfátů, které byly mezitím uvolněny ze sedimentu, a opět je váže zpět do sedimentu. Tím je prudce omezena dostupnost fosforu pro fytoplankton v epilimniu (Kopáček et al., 2000). V tomto případě by mohly být ve výhodě organismy, které produkují extracelulární fosfatázy. Může ale nastat i situace, kdy hliníkové ionty omezí nejen dostupnost fosforu, ale ovlivní i činnost fosfatáz. Bittl et al. (2001) studovali přímý vliv hliníku na extracelulární fosfatázy planktonu acidifikovaných šumavských jezer (Černé jezero, Čertovo jezero, Plešné jezero). Byl testován vliv různých koncentrací hliníku ( $0\text{--}1000\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$ ) na kinetické parametry kyselých fosfatáz při pH mezi 4,5 a 5,2 (optimum pro kyselé fosfatázy je pH 5,0). Byla zjištěna výrazná redukce afinity substrátu při koncentracích 300 a  $1000\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$  při pH 4,5 a 4,8 (ne při pH 5,2). Naproti tomu aktivita kyselých fosfatáz zůstala nezměněna. Na základě tohoto zjištění lze předpokládat, že hliník funguje jako kompetitivní inhibitor kyselých fosfatáz nebo je aktivita fosfatáz nízká díky tvorbě komplexů hliníku se substrátem. Byly testovány obě hypotézy (kompetitivní inhibice nebo vliv tvorby komplexů). Výsledky naznačují, že pravděpodobnější je kompetitivní model. Byl také testován vliv hliníku v pH od 4,0 do 6,0. Při hodnotě 5,2 výsledky dokonce ukazují na efekt, že čím vyšší jsou koncentrace hliníku, tím větší je rozmezí pH, ve kterém hliník negativně ovlivňuje kyselé fosfatázy (Bittl et al., 2001).

Produkce extracelulárních fosfatáz byla měřena na přírodních vzorcích tří populací obrněnek ze šumavských jezer – *Gymnodinium uberrimum*, *Gymnodinium* sp. a *Peridinium umbonatum*. Úhrnná fosfatázová aktivita byla měřena metodou MUFP a fosfatázová aktivita jednotlivých buněk byla měřena metodou FLEA. Vzorky byly vyhodnocovány ihned po odběru na lokalitách. Byl studován vliv přítomnosti hlinitých iontů a dalších faktorů (dostupnost světla, mixotrofie, vliv zooplanktonu) na produkci extracelulárních fosfatáz. Byl prokázán signifikantní vliv ( $P < 0,05$ ) hliníkových iontů dohromady s pH, další faktory ovšem

mohou hrát také roli na buněčně specifickou produkci extracelulárních fosfatáz (Novotná et al., 2010).

Hliník může pravděpodobně v kyselém prostředí blokovat substráty pro fosfatázy. Vzorky řas z jezera Gardsjön (pH 4,6), inkubované ve vodě obohacené hliníkem, byly fosfatázově aktivní. Řasy produkovaly více fosfatáz kvůli snížené dostupnosti fosforu. Atmosféricky acidifikované jezero Gardsjön bylo v osmdesátých letech monitorováno poté, co bylo jeho pH zvýšeno metodou vápnění. Předpokládalo se, že zvýšení pH ze 4,6 na 7,6 způsobí dostupnost fosforu v jezeře, protože poklesne koncentrace volných hliníkových iontů. Tento předpoklad se nepotvrdil, fosfatázová aktivita byla vyšší před vápněním jezera. Je možné, že fosfatázy v tomto jezeře měly nižší optimum pH (byly to tzv. kyselé fosfatázy). Změnou pH došlo také ke změnám v druhovém složení a biomase. Při nižším pH nejspíš dominovaly fytoplanktonu druhy, které byly schopny produkovat větší množství fosfatáz než druhy, které dominovaly při vyšším pH (Jansson, 1981).

#### **2.2.4. Vliv nízkého pH na druhové složení a biomasu fytoplanktonu**

Organismy žijící v kyselém prostředí musí být adaptované na rozdílné chemické a fyzikální podmínky. Kromě zvýšené koncentrace vodíkových iontů musí překonávat i další obtíže, jako je například zvýšená koncentrace kovových iontů nebo omezená dostupnost živin (dochází k oligotrofizaci lokalit). Acidifikované lokality jsou charakteristické velmi nízkou druhovou diverzitou. V nízkém pH dominují acidofilní či acidotolerantní druhy (Johnson, 1998; Gross, 2000). Acidifikace může snížit primární produkci fytoplanktonu, ale je těžké určit, jestli je to díky pH nebo díky snížené dostupnosti živin, především fosforu. Nicméně rozšíření kvantitativně významných druhů fytoplanktonu zcela jistě souvisí s pH lokality, protože různé druhy mají odlišnou schopnost snášet nízké hodnoty pH (Almer, 1974; Lessmann et al., 2000). V jezerech s pH > 6 je biomasa v průměru rozložena mezi všechny skupiny fytoplanktonu. V jezerech s pH menším než 5 je druhové zastoupení homogenní a poměrně chudé. V pH < 3 se vyskytuje jen okolo 10 druhů, z nichž některé tvoří dominantní populace (Almer, 1974; Nixdorf et al., 1998; Lessmann et al., 2000; Beulker, 2003). Zelené řasy (Chlorophyta) jsou nejvíce zastoupenou skupinou v acidifikovaných lokalitách (*Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Chlorella*, *Klebsormidium*). Dále se zde obvykle vyskytují druhy ze skupiny Heterokontophyta - Bacillariophyceae (*Eunotia*, *Fragilaria*, *Nitzschia*, *Pinnularia*) a Chrysophyceae (*Ochromonas*, *Chromulina*, *Dinobryon*), Cryptophyta



(*Cyathomonas*, *Rhodomonas*), Dinophyta (*Gymnodinium*, *Peridinium umbonatum*) a Euglenophyta (*Euglena mutabilis*, *Lepocinclis teres*) v závislosti na stupni pH a přítomnosti toxických kovových iontů (Nixdorf et al., 1998; Lessmann a Nixdorf, 2000; Lessmann et al., 2000; Aguilera et al., 2007; Novis a Harding, 2007).

### 2.3. Extracelulární fosfatázy

Většina organického materiálu je ve vodním prostředí přítomna jako polymerické vysokomolekulární látky (Allen, 1976; Münster a Chróst, 1990). Průchod organických molekul skrz mikrobiální cytoplazmatickou membránu je aktivní proces, který vyžaduje specifické transportní enzymy (permeázy). Skrz membránu mohou být přímo přenášeny pouze nízkomolekulární látky a jednoduché molekuly. Jen malý zlomek z celkového rozpuštěného organického materiálu je tedy snadno využitelný a většina nemůže být přímo inkorporována do buněk, protože jsou molekuly příliš velké (Geller, 1985; Münster, 1985; Chróst, 1991a).

Fytoplankton může přijímat fosfor pouze ve formě rozpuštěných ortofosfátů ( $P_i$ ), jejichž zásobník může být často vyčerpán (Cotner a Wetzel, 1992; Hernández et al., 1996).

Nedostatek fosforu je limitujícím faktorem pro růst fytoplanktonu a může ve sladkovodním prostředí působit jako selektivní tlak na populace fytoplanktonu. Řasy mají několik adaptací, jak se s nedostatkem fosforu vypořádat. Je jím například zvýšený příjem ortofosfátů, zpomalení metabolických pochodů či využití fosforu z uložených polyfosfátových zásob. Dalším mechanismem je produkce extracelulárních fosfatáz (Jansson et al., 1988; Štrojsová a Vrba, 2006).

V posledních několika desetiletích se zkoumalo, jaké biochemické nebo molekulární ukazatele jsou vhodné pro určení limitace daného prvku. V úvahu byly brány například enzymatická aktivita, kinetika příjmu prvků, poměr pigmentů, množství nukleových kyselin v DNA, RNA a proteinech, membránové přenašeče, proteiny syntetizované v době nedostatku prvku, atd. (Scanlan a Wilson, 1999; Beardall et al., 2001). Pro fosfor je dnes často používaným ukazatelem fosfatázová aktivita, protože se vyskytuje napříč fylogenetickými liniemi, lze snadno stanovit, poskytuje kvantitativní data a druhově specifickou informaci (Kuenzler a Perras, 1965; Jansson et al., 1988; Gonzáles-Gil et al., 1998; Nedoma et al., 2003; Štrojsová et al., 2003; Štrojsová a Vrba, 2006).

### 2.3.1. Charakteristika fosfatáz

Fosfatázy patří do skupiny enzymů, které štěpí molekuly substrátu za přítomnosti vody, tedy do skupiny hydroláz. Katalyzují hydrolýzu různých forem esterových vazeb (včetně esterů primárních a sekundárních alkoholů, fenolů, aminů a polyfosfátů), ze kterých uvolňují anorganický fosfor (Feder, 1973; Chróst, 1991a). Fosfatázy, které se ve sladkovodním prostředí vyskytují nejčastěji, jsou fosfomonoesterázy či fosfomonoesterhydrolázy, tedy enzymy, které katalyzují hydrolýzu fosfomonoesterů (Jansson et al., 1988). Kromě nich existují ještě fosfodiesterázy (které zahrnují i nukleázy) a fosfonáthydrolázy. Vyskytují se však vzácně a rychlost jejich působení je pomalá, fosfomonoesterázy jsou tedy považovány za klíčové činidlo v koloběhu fosforu ve sladkovodních ekosystémech (Clark et al., 1998).

Fosfatázy ve vodním prostředí můžeme třídit podle dvou kritérií, které určují jejich biologické a ekologické funkce v prostředí. Prvním kritériem je pH - fosfatázy jsou označovány jako kyselé či zásadité podle toho, v jakém pH je jejich reakční optimum (mají maximální schopnost hydrolyzovat substrát za různých hodnot pH). Alkalické fosfatázy mají optimum nad pH 7, obvykle mezi 9 a 10. Kyselé fosfatázy jsou naopak nejvíce aktivní v pH pod 7, obvykle mezi 4 a 6 (Jansson et al., 1988; Vincent et al., 1992). Dalším kritériem je jejich umístění vzhledem k buňce. Intracelulární fosfatázy se vyskytují v cytoplazmě a organelách. Ektofosfatázy jsou vázané na buněčnou membránu nebo stěnu a reagují s organofosfáty v bezprostředním okolí buňky. Extracelulární fosfatázy jsou aktivně vylučovány buňkou do okolí, kde se rozpouští. Ekologická role ektofosfatáz i extracelulárních fosfatáz je stejná (Overbeck, 1991; Chróst a Siuda, 2002). Extracelulární enzymy tedy spojují okolní prostředí buňky s její membránou a umožňují získávání a transport substrátů či prvků potřebných pro vnitrobuněčný metabolismus (Wetzel, 1991). Volné extracelulární fosfatázy v nádrži jsou významnou částí celkové enzymatické aktivity planktonu, jejich podíl může dosáhnout až 30 % (Chróst et al., 1984).

Extracelulární fosfatázy jsou produkovány bakteriemi, houbami, řasami a zooplanktonními organismy (Jansson et al., 1988; Quisel et al., 1996). Fosfatázová aktivita je rozšířená i u vyšších rostlin, kde jsou fosfatázy produkovány na povrchu buněk apikálního meristému kořenů, aby získaly  $P_i$  z půdy (Duff et al., 1994).

Někdy jsou fosfatázy označovány jako indukovatelné, protože se uvažuje o tom, že jejich produkci spouští nedostatek fosforu nebo změna koncentrace fosforu v prostředí. Tento předpoklad nebyl ovšem nikdy spolehlivě prokázán (Quisel et al., 1996). O regulaci indukovatelných fosfatáz u fotosyntetizujících eukaryot víme málo. Bylo izolováno několik

genů, které kódují fosfátové transportéry s vysokou afinitou, RNázy a fosfatázy (Duff et al., 1994). Nedávno bylo osekvenováno několik genů kódujících fosfatázy z mořských druhů řas a fylogenetická analýza ukázala, že tyto geny pocházejí pravděpodobně ze společného bakteriálního předka (Lin et al., 2015). Fosfatázová aktivita závisí na typu a koncentraci substrátu i enzymu, také na teplotě, iontové síle, pH a přítomnosti kovových iontů (Jansson et al., 1988). Aktivita mikrobiálních enzymů může být zastavena různými inhibitory přítomnými v okolním prostředí. Jsou známy dva typy inhibice - kompetitivní a nekompetitivní. Kompetitivní inhibice nastane, když je inhibitor strukturně podobný substrátu a naváže se na vazebné místo substrátu. Kompetitivní inhibitory extracelulárních enzymů jsou charakteristické tím, že snižují afinitu enzymu k substrátu a tudíž snižují rychlost celé reakce. Inhibitor extracelulárních fosfatáz je Pi, který konkuruje substrátu ve vazbě na fosfatázové aktivním místě na povrchu buňky a proto zastavuje počáteční rychlost reakce (Halemejko a Chróst, 1986; Chróst, 1991b).

### **2.3.2. Další mikrobiální enzymy**

Kromě fosfatáz se ve vodním prostředí vyskytují také další extracelulární enzymy. Heterotrofní mikroorganismy (hlavně bakterie a houby) ve vodě i v sedimentech produkují beta-glukosidázy (beta-D-glukosid glucohydrolázy). Beta-glukosidázy jsou enzymy se širokým účinkem, které katalyzují hydrolýzu disacharidů spojené beta vazbou, tedy glukózy, celulózy a karboxymethylcelulózy. Nejvíce jich je produkováno během jarního maxima fytoplanktonu (Chróst, 1989; Chróst, 1991b). Dalšími významnými enzymy ve vodním prostředí jsou aminopeptidázy (L-leucyl-peptid hydrolázy). Aminopeptidázy jsou produkovány bakteriemi a katalyzují hydrolýzu velkého množství peptidů a amidů aminokyselin s L-konfigurací. Tyto enzymy jsou nejvíce produkovány během jarních a letních maxim fytoplanktonu. V tomto období výrazně narůstá i obsah proteinů ve vodě díky degradaci řasových buněk (Rego et al., 1985; Halemejko a Chróst, 1986; Jacobsen a Rai, 1988).

### **2.3.3. Aktivita extracelulárních fosfatáz ve sladkovodním prostředí**

Extracelulární fosfatázová aktivita planktonu byla poprvé popsána německým biochemikem Maximilianem Steinerem v roce 1938. Pomocí filtračních experimentů na zooplanktonu došel

k názoru, že dostupnost fosforu pro fytoplankton v epilimniu není možná bez účasti fosfatáz, nebyl ovšem určen jejich původ (Steiner, 1938). V roce 1959 zveřejnil Jürgen Overbeck vůbec první studii týkající se volně rozpuštěných enzymů ve sladkovodním prostředí. Objektem jeho výzkumu byla malá nádrž s dostatečným a pravidelným přísunem organických forem fosforu, přičemž koncentrace anorganických forem fosforu v nádrži byla velmi nízká. Přesto se zde dařilo fytoplanktonním organismům. Otázkou tedy bylo, jaké další substráty obsahující fosfor může fytoplankton využívat a jak k tomu dochází. V dalších letech byly prováděny experimenty se zelenou řasou *Scenedesmus quadricauda*, která byla na lokalitě dominantní. Axenická kultura této řasy nebyla schopná přijímat jinou formu fosforu než anorganické fosfáty. Po přidání suspenze bakterie *Escherichia coli* byly ovšem organické substráty téměř okamžitě naštěpeny pomocí bakteriálních extracelulárních fosfatáz a zpřístupněny pro buňky řas. Extracelulární enzymy jsou tedy zcela zásadním článkem, který musíme vzít v úvahu, abychom pochopili fungování vodních ekosystémů (Overbeck, 1961; Overbeck, 1962; Overbeck a Babenzien, 1964; Overbeck, 1967; Reichardt a Overbeck, 1967; Overbeck 1991).

Několik prací se zabývalo měřením úhrnné fosfatázové aktivity (tzv. bulk activity) v přírodních populacích planktonu. Úhrnná fosfatázová aktivita planktonu byla v minulosti prohlášena za indikátor nedostatku fosforu v prostředí (Healey a Hendzel, 1980; Gage a Gorham, 1985). Úhrnná fosfatázová aktivita celého vzorku zahrnuje fosfatázy na povrchu buněk řas a bakterií (Chróst, 1991a) a také volně rozpuštěné fosfatázy, které mají původ z lyzovaných buněk nebo jako produkt exkrece řas, bakterií, zooplanktonu a protozoí (Jansson et al., 1988). Je proto potřeba měřit fosfatázovou aktivitu spíše na úrovni jednotlivých druhů a buněk.

Existuje ovšem velmi málo prací o měření fosfatázové aktivity v řasových kulturách a v rámci jednotlivých buněk. Měření fosfatázové aktivity u řasových kultur poskytuje druhově specifickou informaci, ovšem nedá se s jistotou určit, zda by daný druh reagoval stejně v přírodním prostředí (Štrojsová a Vrba, 2009).

Fosfatázová aktivita může být aktivována v podmínkách s nízkou koncentrací  $P_i$  a bylo pozorováno, že fosfatázová aktivita fytoplanktonu roste za nedostatku rozpuštěných anorganických forem fosforu, a to jak v přírodních vzorcích, tak i v kultuře (Fitzgerald a Nelson, 1966; Healey a Hendzel, 1979; Pettersson, 1980; Siuda, 1984; Vrba et al., 1993; Štrojsová et al., 2005). Není ale úplně jasné, jestli je aktivita závislá na koncentraci  $P_i$  v okolním prostředí. Mechanismus spouštění produkce fosfatáz je zřejmě regulován také vnitrobuněčnou koncentrací  $P_i$  (Chróst a Overbeck, 1987; Litchman a Nguyen, 2008;

Štrojsová et al., 2008). Například na zelené řase *Scenedesmus quadricauda* a rozsivce *Asterionella formosa* bylo ověřováno, zda je fosfatázová aktivita spouštěna nedostatkem fosforu v prostředí či nedostatkem fosforu v buňkách. Bylo zjištěno, že fosfatázová aktivita u obou druhů silně koreluje s obsahem fosforu uvnitř buněk. Aktivita stoupá téměř lineárně s klesajícím obsahem fosforu v buňkách. Je tedy pravděpodobné, že spouštěčem fosfatázové aktivity je spíše vnitrobuněčný stav fosforu (Litchman a Nguyen, 2008). Naopak zelená řasa *Chlamydomonas reinhardtii* kultivovaná v médiu bez fosforu nebo s minimálním podílem anorganických fosfátů produkuje kyselé i zásadité extracelulární a intracelulární fosfatázy. Když byl  $P_i$  do média přidáván, produkce fosfatáz byla potlačena (Patni et al., 1977).

Kultury *Alexandrium fundyense*, *Amphidinium* sp. (Dinophyceae) a *Isochrysis galbana* (Haptophyceae) byly fosfatázově aktivní pouze když byly kultivovány v médiu s malým množstvím  $P_i$  (González-Gil et al., 1998). Dále byla pozorována odpověď na nedostatek  $P_i$  v kultuře i v přírodních populacích mořského druhu *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae). V kultuře také vykazovaly buňky fosfatázovou aktivitu při nedostatku  $P_i$  a zároveň přestaly extracelulární fosfatázy produkovat šest dní poté, co bylo médium o  $P_i$  doplněno. Toto pozorování naznačuje, že jedním z možných mechanismů, jak překonávat nedostatek  $P_i$  je kromě zvýšeného příjmu  $P_i$  a spotřebování zásob polyfosfátů také produkce extracelulárních fosfatáz (Dyhrman a Palenik, 1999).

Několik prací se věnovalo sezónnímu průběhu fosfatázové aktivity planktonu. Celková fosfatázová aktivita planktonu se v dimiktické nádrži mírného klimatického pásu mění sezónně. V případě, že je fosfor dostupný ve formě ortofosfátů, je ho fytoplankton schopen přijímat ve značném množství. Proto dochází v epilimniu většiny přírodních vod pravidelně k vyčerpání zásobníku  $P_i$  jako důsledek růstu a rozmnožování fytoplanktonních druhů (Cotner a Wetzel, 1991; Wetzel, 2001). Nejnížší fosfatázová aktivita bývá během jarního a podzimního míchání a v zimě, kdy je  $P_i$  ve vodě dostatek. Nejvyšší aktivita je během růstového maxima fytoplanktonu na jaře a v létě, kdy je zásobník  $P_i$  vyčerpáván (Chróst et al., 1984; Wetzel, 2001).

Sezónní průběh fosfatázové aktivity fytoplanktonu byla měřena na přehradě Římov (Štrojsová et al., 2003). Fosfatázová aktivita nebyla pozorována na počátku jara (březen) a během fáze „clear water“ několik let po sobě. Druhy ze skupin Cyanobacteria, Chlorophyceae a Conjugatophyceae vykazovaly nejvyšší fosfatázovou aktivitu v létě a na začátku podzimu. Některé druhy byly ve vzorku aktivní vždy (*Ankyra ancora*, *Ankyra judayi*, *Coelastrum pseudomicroporum*, *Eudorina elegans*, *Pediastrum* spp.). Některé druhy byly fosfatázově aktivní jen v určitém ročním období (*Aphanizomenon flos-aquae*, *Cryptomonas* spp.)

(Štrojsová et al., 2003). Fosfatázová aktivita u *Monoraphidium dybowskii* (dnes *Coccomyxa* sp.), dominantní řasy fytoplanktonu v Plešném jezeře, se také mění sezónně. Nejvyšší fosfatázová aktivita byla zaznamenána v epilimniu na konci května. To může být způsobeno zvýšeným příjmem  $P_i$  v průběhu populačního růstu. Fytoplankton v Plešném jezeře ovšem produkuje fosfatázy celoročně, protože zde dochází k limitaci fosforem díky nízkému pH (Štrojsová a Vrba, 2006).

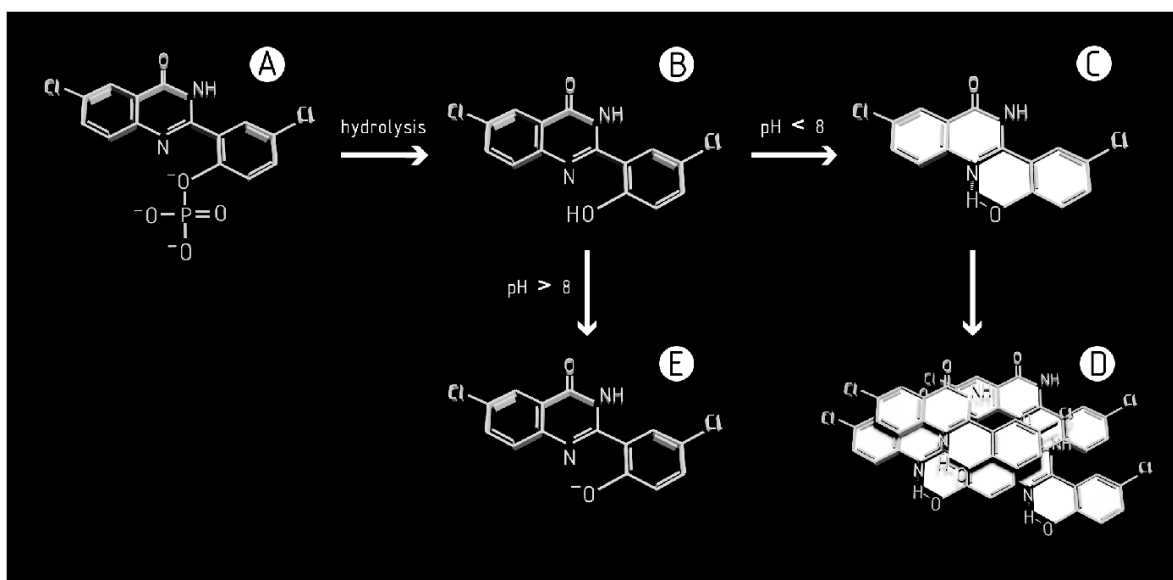
Fosfatázová aktivita se liší mezi jednotlivými druhy fytoplanktonu i mezi jednotlivými buňkami populace jednoho druhu (Rengefors et al., 2001; Dyhrman et al., 2002; Štrojsová et al., 2003; Cao et al., 2005, 2009). Při měření sezónní fosfatázové aktivity na přehradě Římov bylo zjištěno, že zástupci fytoplanktonu byli aktivní napříč téměř všemi taxonomickými skupinami (kromě Euglenophyceae), nejvíce Chrysophyceae a Cryptophyceae. Z 56 druhů, které byly určeny ve vzorku, byla fosfatázově aktivní pouze jedna třetina. I v rámci populace jednoho druhu nebyly aktivní všechny buňky a u aktivních bylo naměřeno různé množství extracelulárních fosfatáz (Štrojsová et al., 2003). V kultuře *Prorocentrum minutum* byla pozorována fosfatázová aktivita ve 26 různých vzorcích u 12–100 % buněk (Dyhrman a Palenik, 1999). Během pozorování přírodních populací fytoplanktonu v přehradě Římov bylo zjištěno, že několik druhů běžně produkuje extracelulární fosfatázy. Patří mezi ně *Anabaena* spp., *Microcystis aeruginosa*, *Woronichinia naegeliana*, *Ceratium hirundinella*, *Peridinium* spp., *Eudorina elegans*, *Ankyra ancora*, *Ankyra judayi*, *Pediastrum boryanum* a *Planktosphaeria gelatinosa* (Štrojsová et al., 2003). U některých druhů naopak nebyla fosfatázová aktivita nikdy pozorována (např. *Aphanotece* sp., *Dinobryon divergens*, *Rhodomonas minuta*, *Tetrastrum* spp.). V Plešném jezeře bylo nejvíce aktivních buněk mezi zástupci rodů *Chlorogonium*, *Cryptomonas*, *Chlamydomonas*, *Gymnodinium*, dále produkovaly extracelulární fosfatázy i sinice *Limnothrix* a *Pseudanabaena* a vláknité bakterie (Nedoma et al., 2003; Novotná et al., 2010). Nelze ovšem najít trend, který by vysvětloval druhově specifickou produkci fosfatáz (Štrojsová et al., 2003, 2005).

Z toho se dá usuzovat, že různé druhy řas mají různé nároky na fosfor a že pravděpodobně uplatňují různé strategie při získávání fosforu z okolního prostředí. Podobně také buňky v rámci jedné populace se liší ve svém aktuálním fyziologickém stavu, a tudíž jsou různé i jejich potřeby k získávání fosforu z okolního prostředí (Rengefors et al., 2001; Štrojsová et al., 2003).

#### 2.3.4. Metody stanovení fosfatázové aktivity

Metoda FLEA (fluorescence labelled enzyme activity) umožňuje pomocí umělého substrátu a epifluorescenční mikroskopie přímou lokalizaci fosfatázové aktivity.

Rozpustný umělý substrát ELF<sup>®</sup>97 fosfát (ELFP; 2-(5'-chloro-2'-fosforyloxyfenyl)-6-chloro-4-(3H)-quinazolinon) je rozštěpen pomocí fosfatáz produkovaných na povrchu buněk za vzniku ELF alkoholu (ELFA), který vytváří ve vodě nerozpustnou fluorescentní sraženinu (Huang et al., 1992). ELFA tedy dokáže zviditelnit na povrchu buněk fosfatázově aktivní místa. Tímto způsobem je možné fosfatázy na buňce přesně lokalizovat (Huang et al., 1992; González-Gil et al., 1998; Nedoma et al., 2003; viz Obr. 1).



**Obr. 1.** Odštěpení fosfátové skupiny z molekuly ELFP pomocí fosfatáz a schéma vzniku molekuly ELFA za různých hodnot pH. A – ELF fosfát, B – ELF alkohol, C – ELF alkohol s vodíkovou vazbou, která vzniká při pH < 8, D – srážení ELF alkoholu v místě enzymatické aktivity, E – při pH > 8 vzniká fenylový anion, který není fluorescentní (převzato ze Štrojsová a Vrba, 2006).

Signál ELFA na buněčném povrchu lze pozorovat pod epifluorescenčním mikroskopem a je možné jej analyzovat pomocí obrazové cytometrie (González-Gil et al., 1998; Nedoma et al., 2003). Výhoda použití metody FLEA spočívá také v tom, že signál ELFA je vysoce fotostabilní a nespecifická fluorescence na pozadí snímků je obvykle velmi nízká (Paragas et al., 1997; Cox a Singer, 1999).

Metoda FLEA byla vynalezena na počátku 90. let 20. století pro označování fosfatázové aktivity při imunologických a histologických výzkumech (Larison et al., 1995). Brzy našla

uplatnění i v jiných oborech a stala se tak cenným nástrojem i pro hydrobiologii. První studie se zabývaly měřením fosfatázové aktivity v kulturách autotrofních protist a přírodních vzorků fytoplanktonu (González-Gil et al., 1998; Dyhrman a Palenik, 1999; Rengefors et al., 2001; Štrojsová et al., 2003), vířníků (Štrojsová a Vrba, 2005) i bakterií (např. Nedoma a Vrba, 2006).

Metoda FLEA je vhodná pro vyhodnocení fosfatázové aktivity u všech taxonomických skupin fytoplanktonu. Pomocí většiny standardních metod lze měřit v přírodních vzorcích pouze úhrnnou aktivitu (tzv. bulk activity) a schopnost produkovat fosfatázy v kultuře za určitých podmínek, metoda FLEA umožňuje získat přímé a specifické informace o produkci extracelulárních fosfatáz u fytoplanktonu a tím i otevírá nové možnosti ve výzkumu (Štrojsová et al., 2003).

Existují i jiné metody, pomocí nichž lze měřit fosfatázovou aktivitu fytoplanktonu, metoda FLEA je ovšem pro tuto práci nejvhodnější. Příkladem metody, která se standardně využívá při měření fosfatázové aktivity je fluorogenní substrát 4–methylumbelliferyl fosfát (MUFP; Petterson, 1980; Hoppe, 1983). MUFP, který je hydrolyzován extracelulárními fosfatázami, vytváří fluorescentní rozpustný produkt, který lze vyhodnotit fluorometricky. Tato metoda ovšem ukazuje pouze úhrnnou fosfatázovou aktivitu celého vzorku. Tudíž není možné zjistit, který organismus či který druh je fosfatázově aktivní. Lze ovšem zjistit podíl fosfatázově aktivních a neaktivních buněk (Štrojsová et al., 2003).

U několika sladkovodních druhů fytoplanktonu byla pozorována fosfatázová aktivita pomocí metody FLEA a porovnána s metodou MUFP. Bylo potvrzeno, že pomocí MUFP byla naměřena fosfatázová aktivita nejen řas, ale i bakterií a zooplanktonu (Rengefors et al., 2001).

Díky metodě FLEA byly studovány rozdíly v buněčně i druhově specifické produkci extracelulárních fosfatáz planktonu (Rengefors et al., 2001; Dyhrman et al., 2002; Štrojsová et al., 2003; Cao et al., 2005, 2009; Novotná et al., 2010) a bylo možné studovat rozdíly v krátkodobé i sezónní produkci fosfatáz (Rengefors et al., 2001; Štrojsová et al., 2003, 2005, 2008; Dignum et al., 2004; Cao et al., 2005, 2009; Štrojsová a Vrba, 2006, 2009).

#### **2.4. Taxonomické postavení a ekologie rodu *Coccomyxa* (Chlorophyta)**

Rod *Coccomyxa* je zelená jednobuněčná mikroskopická řasa patřící do třídy Trebouxiophyceae, *Elliptochloris* clade (Friedl, 1995; Pröschold et al., 2011; Darienko et al.,



2015; viz Obr. 2). Zástupci rodu *Coccomyxa* jsou sladkovodní planktonní druhy (Verma et al., 2009; Hrdinka et al., 2013), buňky mohou růst i terestricky jako součást biofilmů nebo půdních nárostů (Lukešová, 2001). Některé druhy jsou symbionty asko- a basidiomycet s nimiž vytvářejí lišejníky (Peveling a Galun, 1976; Zoller a Lutzoni, 2003) nebo vytvářejí symbiotické interakce s vyššími rostlinami (Trémouillaux-Guiller a Huss, 2007). Také byli pozorováni jako parazit slávek (Rodríguez et al., 2008; Syasina et al., 2012). Rod *Coccomyxa* se vyskytuje celosvětově, ve zcela odlišných i extrémních habitatech, dokonce byl nalezen jako kontaminant v chemických roztocích a destilované vodě v laboratořích (Sládečková, 1959; Taylor, 1965) nebo v chladicí nádrži v jaderné elektrárně (Rivasseau et al., 2013). Buňky rodu *Coccomyxa* jsou asi 6–14  $\mu\text{m}$  dlouhé a 3–6  $\mu\text{m}$  široké, mají nepravidelný oválný tvar, parietální chloroplast bez pyrenoidu a žádné pohyblivé stádium (Komárek et al., 1983; Albertano et al., 1990).



**Obr. 2.** Morfologická plasticita druhu *Coccomyxa polymorpha*. Měřítko je 10  $\mu\text{m}$ . (Darienko et al., 2015).

Na základě morfologie byly v minulosti řasy podobné rodu *Coccomyxa* zařazeny do tří skupin. Všechny druhy, které postrádaly slizovitý obal, byly zařazeny do rodu *Choricystis* a všechny druhy, které měly na jednom konci buňky slizovité víčko, byly zařazeny do rodu *Pseudococcomyxa* (Fott, 1976). Druhy se slizovitým obalem byly zařazeny do rodu *Coccomyxa* (Komárek et al., 1983). Podle revize taxonomie na základě molekulárních dat se prokázalo, že rod *Choricystis* tvoří v rámci třídy Trebouxiophyceae samostatnou fylogenetickou linii (Pröschold et al., 2011). Podle nejnovějších studií, jsou rody *Coccomyxa* a *Pseudococcomyxa* monofyletické (Nemjová, 2009; Darienko et al., 2015). Druhy dominující v Plešném jezeře a v Hromnickém jezírku byly určeny jako nové kmeny z okruhu *Coccomyxa simplex* (Barcyte, 2015).

### 3. Cíle a hypotézy

Hlavním cílem této práce je ověřit, zda je možné v laboratorních podmínkách indukovat extracelulární fosfatázovou aktivitu kmenů z rodu *Coccomyxa* (Chlorophyta) izolovaných z planktonu dvou acidifikovaných jezer. Hromnické jezírko a Plešné jezero se liší dostupností fosforu a *Coccomyxa* sp. je dominantním druhem fytoplanktonu. Extracelulární fosfatázová aktivita mu může poskytovat kompetiční výhodu oproti jiným acidotolerantním druhům fytoplanktonu, které nejsou fosfatázově aktivní.

Dále bylo mým cílem řešit následující úkoly a ověřit tyto hypotézy:

1. Ověřit časový průběh fosfatázové aktivity při různé době inkubace s fluorogenním substrátem ELFP.

*Enzymatická hydrolýza ELFP je lineární, tedy fosfatázová aktivita roste s časem.*

2. Stanovit aktivitu extracelulárních fosfatáz na buněčné úrovni v kulturách *Coccomyxa* sp.

*Při stejné koncentraci fosforu je fosfatázová aktivita všech buněk v populaci stejná.*

3. Zjistit vliv koncentrace a formy fosforu na extracelulární fosfatázovou aktivitu obou kmenů *Coccomyxa* sp.

*V laboratorních podmínkách je možné u druhu *Coccomyxa* sp. indukovat extracelulární fosfatázovou aktivitu a to jak snížením koncentrace anorganického fosforu, tak i kultivací s organickou formou fosforu.*

4. Porovnat aktivitu extracelulárních fosfatáz dvou testovaných kmenů *Coccomyxa* sp. *Produkce extracelulárních fosfatáz je vyšší u kmene izolovaného z lokality dlouhodobě limitované fosforem.*

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Odběrové lokality

#### 4.1.1. Plešné jezero

Plešné jezero (48°46'35" N, 13°51'55" E; 1087 m n. m.) se nachází na Šumavě v České republice. Má rozlohu 7,5 ha, objem 617 000 m<sup>3</sup>, maximální hloubka je 18 m. Povodí jezera má rozlohu 66,6 ha a podloží je tvořeno žulou (Veselý, 1994; Vrba et al., 2000). Jezero je ledovcového původu, má tři přítoky, dva povrchové a jeden podpovrchový. Je obklopené strmými kamenitými zalesněnými svahy. Les se rozkládá asi na 70 % povodí jezera. Vegetaci dominuje nepůvodní porost *Picea abies* (99 %). Lesní půda v povodí jezera je důležitým zdrojem fosforu a organického uhlíku pro povrchové přítoky jezera (Kopáček et al., 2000).

Plešné jezero je dimiktické, oligotrofní až mesotrofní (koncentrace chlorofylu-*a* se pohybuje kolem 16–33 µg l<sup>-1</sup>). Během zimní a letní stratifikace je hypolimnion anoxické (Kopáček et al., 2000, 2004; Nedbalová et al., 2006; Vrba et al., 2016).

V průběhu 20. století byla oblast šumavských jezer a tedy i povodí Plešného jezera postižena atmosférickou acidifikací. Na počátku 20. století se hodnoty pH jezera pohybovaly mezi 6 a 6,5 (Kopáček et al., 2007). V 60. letech došlo k vyčerpání zásaditých kationtů v půdě a následnému vyčerpání uhličitánového pufracího systému jezera a hodnota pH se pohybovala pod 5,4. Acidifikace postupovala až do 80. let, kdy se hodnota pH pohybovala mezi 4,4 a 4,7 (Veselý et al., 1998; Kopáček et al., 2000, 2007). V současné době se jezero zotavuje z acidifikace (pH je 5–5,4), ale uhličitánový pufrací systém je stále vyčerpán a je zde zvýšená koncentrace síranových a dusičnanových aniontů (Hejzlar et al., 1998; Kopáček et al., 2000; Vrba et al., 2016). V jezeře je díky acidifikaci zvýšená koncentrace hliníkových iontů. Během 80. let dosahovala koncentrace volných hliníkových iontů hodnoty až 395 µg l<sup>-1</sup> (Fott et al., 1994). Od té doby došlo k částečnému zotavení jezera z acidifikace a koncentrace hliníkových iontů také poklesla. V roce 1999 koncentrace hliníkových iontů dosahovala 56 µg l<sup>-1</sup> (Vrba et al., 2000) a v roce 2003 již jen 24 µg l<sup>-1</sup> (Nedbalová et al., 2006). V současné době je koncentrace hliníkových iontů 72 ± 65 µg l<sup>-1</sup> (Vrba et al., 2016). Přítoky a voda v jezeře mají rozdílné pH a tento gradient má vliv na vznik různých forem hliníku. Ten nadále ovlivňuje dostupnost fosforu v jezeře. Přítoky Plešného jezera mají ze všech šumavských jezer nejvyšší koncentraci SRP (9,6 µg l<sup>-1</sup>), která se ale v epilimniu díky srážení s hydroxidy hliníku a spotřebě fytoplanktonem snižuje (<1 µg l<sup>-1</sup>; Kopáček et al., 2000; Nedbalová et al., 2006).

V důsledku acidifikace zde nežijí žádné ryby a zastoupení zooplanktonních druhů je také malé (<1% z celkové biomasy planktonu). Vyskytuje se zde několik druhů vířníků (*Brachionus urceolaris* var. “*sericus*”, *Collotheca pelagica*, *Keratella serrulata*, *Microcodon clavus*, *Synchaeta tremula*) a dva druhy klanonožců (*Acanthocyclops vernalis*, *Heteroscoelus saliens*) (Kopáček et al., 2000, 2004; Nedbalová et al., 2006). V letech 2004-2006 se v Plešném jezeře podařila úspěšná reintrodukce druhu *Cyclops abyssorum*, který byl do jezera dovezen z nedalekého Prášilského jezera (Kohout a Fott, 2006).

Díky zvýšenému přísunu fosforu oproti okolním jezerům má Plešné jezero unikátní oživení, až 70 % biomasy tvoří fytoplanktonní organismy. V jezeře dominuje zelená řasa *Monoraphidium dybowskii* (později určena jako nový kmen z okruhu *Coccomyxa simplex*, viz kap. 2.4) a sinice *Pseudanabaena* sp. a *Limnothrix* sp. (Nedbalová a Vrtiška, 2000; Nedbalová et al., 2006). V menší míře se zde vyskytují další acidotolerantní řasy ze skupin Dinophyceae (*Gymnodinium* sp., *Katodinium bohemicum*, *K. planum*, *Peridinium umbonatum*), Cryptophyceae (*Cryptomonas erosa*, *C. gracilis*, *C. marssonii*), Chrysophyceae (*Bitrichia ollula*, *Dinobryon* sp., *Ochromonas* sp., *Spiniferomonas* sp.) a Chlorophyta (*Arthrodesmus incus*, *Carteria multifilis*, *Chlamydomonas* sp., *Chlorogonium fusiforme*, *Chloromonas angustissima*, *Koliella corcontica*) (Nedbalová et al., 2006).

#### 4.1.2. Hromnické jezírko

Hromnické jezírko (49°51'03" N, 13°26'39" E; 330 m n. m.) se nachází na Plzeňsku nedaleko obce Hromnice v České republice. Vzniklo antropogenně zatopením bývalého lomu (asi 50 m hluboký, 260 m dlouhý a 150 m široký), v minulosti se zde těžila břidlice s vysokým obsahem sulfidů (pyritu). Jezírko je 221 m dlouhé a 79 m široké, maximální hloubka 14 m. Plocha jezírka je 9 740 m<sup>2</sup> a objem 60 980 m<sup>3</sup>. Okolí je zalesněné, na severu se nachází zemědělsky využívané území. Břeh je poměrně strmý a tvořený zbytky nezpevněné břidlice. Jezírko nemá žádný přítok ani odtok, jen silný podpovrchový přítok. Jezírko je trvale meromiktické, chemoklina v hloubce 3,0–3,5 m odděluje extrémně kyselý mixolimnion (pH 2,3–2,9) a anoxický monimolimnion bohatý na kovové ionty (pH 4,0–4,2) (Hrdinka et al., 2013).

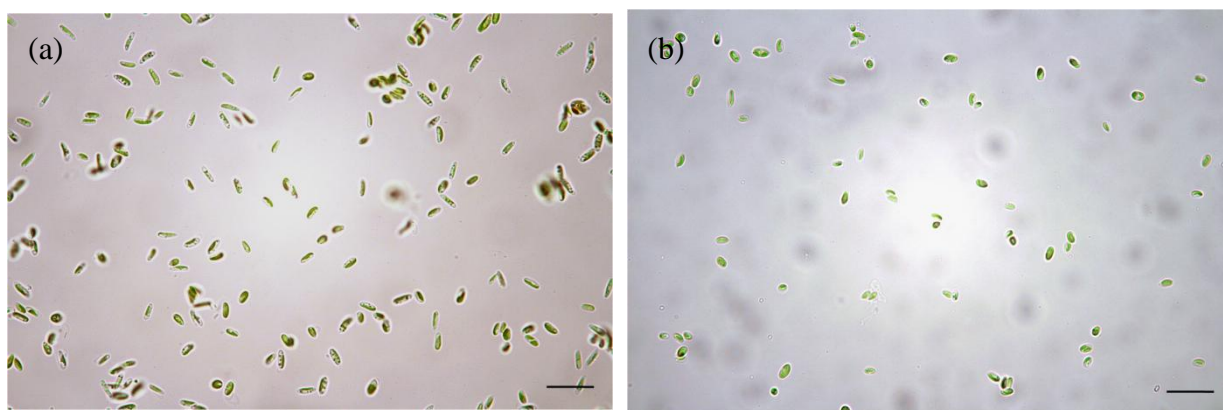
Chemické složení vody je výsledkem rozpouštění sloučenin z břidlic, srážení železitých iontů a dekompozice organického materiálu oxidačně-redukčními procesy. Koncentrace PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> se lišila od 0,04 mg l<sup>-1</sup> u hladiny až po 1,6 mg l<sup>-1</sup> v hloubce 5 a 12 m. Koncentrace NO<sub>3</sub><sup>-</sup> byla naopak u hladiny 24,5 mg l<sup>-1</sup> a v hloubce 5 m pouze 1 mg l<sup>-1</sup>. Je zde zvýšená koncentrace

SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (až 6 410 mg l<sup>-1</sup>) a kovů: Al (až 176 mg l<sup>-1</sup>), Fe (až 2100 mg l<sup>-1</sup>), Mn a Ni (4,56 mg l<sup>-1</sup>), Cu (až 1,52 mg l<sup>-1</sup>), Co (0,56 mg l<sup>-1</sup>) a Pb (0,13 mg l<sup>-1</sup>) (Hrdinka et al., 2013).

Fytoplankton Hromnického jezírka je chudý na počet druhů, ale s vysokým obsahem biomasy. Koncentrace chlorofylu-*a* je 20–50 µg l<sup>-1</sup>, jezírko lze tedy považovat za eutrofni. Nejčastějším druhem je *Coccomyxa* sp. (Chlorophyta), která byla určena jako nový kmen z okruhu *Coccomyxa simplex* (Barcyte, 2015). Dále se zde vyskytují druhy *Lepocinclis* sp. (Euglenophyta), *Chromulina* sp. (Heterokontophyta) a *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta). Na dně jezírka byly nalezeny nárosty vláknitých protonemat mechu. Nevyskytují se zde žádná makrofyta. Ze zooplanktonu se zde nachází larvy pakomára *Chironomus* a acidotolerantní vířníci *Cephalodella* sp. a *Elosa woralii* (Hrdinka et al., 2013).

#### 4.2. Kultivace řas

Přírodní vzorky z Plešného jezera byly odebrány v srpnu 2013 a 2014, z Hromnického jezírka byly odebrány v srpnu 2013. Vzorky byly použity jako inokulum pro založení řasové kultury, použité v této práci (viz Obr. 3). Řasová kultura byla uchovávána v BBM médiu (Bischoff a Bold, 1963), kultivačních destičkách a následovně v Erlenmeyerových baňkách, při pokojové teplotě a na denním světle. Médium bylo průběžně doplňováno a kultura byla pozorována a případně přeočkována kvůli kontaminacím. Všechna média byla okyselena pomocí HCl na pH 4, aby byly podmínky podobné původnímu prostředí řas.



**Obr. 3.** Řasové kultury *Coccomyxa* sp. izolované a) z Hromnického jezírka, b) z Plešného jezera. Měřítko je 10 µm.

Během samotného experimentu byly řasové kultury kultivovány v systému typu chemostat. Kultivace probíhala v dělicích nálevkách s kohoutem, za stálého probublávání

vzduchovačem, stálého osvětlení (zářivky o příkonu 30W) a pokojové teploty (viz Příloha 1). Do 200 ml média bylo naočkováno inokulum o objemu 0,5 ml. Kultivace trvala tři týdny, v průběhu kultivace byla pomocí fluorometru (TD-700 Laboratory Flurometer, Turner Designs) měřena koncentrace chlorofylu-*a* a kultury byly ředěny médiem třikrát až čtyřikrát za dobu kultivace tak, aby se blížila koncentraci  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  (pouze u kultur v nelimitovaném médiu byla koncentrace ředěna tak, aby se blížila  $50 \mu\text{g l}^{-1}$ , což bylo způsobeno mnohonásobně vyšším růstem a rozmnožováním řas v nelimitovaném médiu a následným obtížnějším ředěním). Po třech týdnech byly z kultur odebrány vzorky pro inkubaci s ELFP a výrobu preparátů, fosfatázová aktivita buněk byla stanovena pomocí fluorescenční mikroskopie a analýzy obrazu (viz kap. 2.3.4).

Pro kultivaci byly použity tři typy upraveného BBM média. Jeden typ média (AM) obsahoval anorganické fosforečné soli ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), druhý typ média (OM) obsahoval organickou sůl ( $\beta\text{-GP}$ ,  $\beta\text{-glycerol fosfát}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha, Česká republika) a třetí typ média neobsahoval žádný fosfor (M0). Hmotnost  $\beta\text{-GP}$  potřebného na přípravu zásobního roztoku pro BBM médium byla spočítána tak, aby byla koncentrace fosforu ve všech typech médií (AM a OM) stejná (viz Příloha 2).

Upravené varianty BBM média měly 4 různé koncentrace fosforu - M1 (nelimitované médium), M2 (limitované médium), M3 (limitované médium) a M0 (limitované médium, žádná koncentrace fosforu). Kultivace řas pro všechny z uvedených typů médií probíhala vždy ve třech paralelních pokusech.

Všechny typy médií, hmotnost fosforečných solí a výsledná hmotnost fosforu v jednotlivých typech médií, která byla použita pro přípravu zásobních roztoků, jsou uvedeny v tabulce 1. Originální BBM médium obsahuje v jednom litru 75 mg  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a 175 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

**Tabulka 1.** Typy médií použité v této práci. A – médium s anorganickými fosforečnými solemi, O – médium s organickou solí, M1 – nelimitované médium, M2/M3 – limitované médium, M0 – médium bez fosforu.

Typ média	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	β-GP (mg l <sup>-1</sup> )	P (mg l <sup>-1</sup> )
AM1	37,5	87,5	0	26,6
AM2	0,8	1,8	0	0,5
AM3	0,4	0,9	0	0,3
OM1	0	0	262,9	26,6
OM2	0	0	5,3	0,5
OM3	0	0	2,6	0,3
M0	0	0	0	0

Vybrané vzorky byly zaslány na chemickou analýzu SRP, aby byla ověřena koncentrace fosforu ve vzorcích. Vzorky byly odebrány pro srovnání v polovině doby kultivace a na konci kultivace. SRP byl stanoven fotometricky po reakci v kyselém roztoku v přítomnosti iontů molybdenanu a antimonu za vzniku antimon-fosfomolybdenanového komplexu (podle ČSN EN ISO 6878) v laboratoři Výzkumného ústavu vodohospodářského T. G. Masaryka, v. v. i. (Praha, Česká republika).

### 4.3. Stanovení fosfatázové aktivity

Metoda FLEA umožňuje přímou lokalizaci fosfatázové aktivity. Rozpustný umělý substrát ELF<sup>®</sup>97 fosfát (ELFP; Molecular Probes, Oregon, USA) je rozštěpen pomocí fosfatáz produkovaných na povrchu buněk za vzniku ELFA, který vytváří nerozpustnou fluorescentní sraženinu. Sraženiny ELFA lze pozorovat pomocí fluorescenční mikroskopie (viz kap. 2.3.4).

#### 4.3.1. Inkubace s ELFP

Vzorky (5 ml) byly inkubovány s ELFP 3 hodiny na přímém denním světle za pokojové teploty. Do 5 ml vzorku bylo na počátku inkubace přidáno 20 µl ELFP, výsledná koncentrace ve vzorku tedy byla 20 µmol l<sup>-1</sup>. Po 3 hodinách byl 1 ml vzorku zfiltrován přes polykarbonátový membránový filtr (velikost póru 2 µm; Poretics, California, USA) pomocí

aparatury Sartorius a vyvinutím mírného podtlaku ( $< 20$  kPa). Filtr byl šetrně položen na podložní sklíčko s kapkou imerzního oleje a přikryt krycím sklíčkem. Takto vyrobený preparát byl uchován v mrazáku při  $-20$  °C. Trvanlivost preparátu je v těchto podmínkách až půl roku. V jednom případě byla doba inkubace s ELFP vzorků 1–3 hodiny (vzorky byly odebrány po každé hodině) pro sledování časového průběhu fosfatázové aktivity ve vzorku (Nedoma et al., 2003).

#### **4.3.2. Analýza obrazu**

K výpočtu buněčné specifické fosfatázové aktivity (fluorescence ELFA) byla použita metoda analýzy obrazu, jejíž součástí byl fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 90i (Nikon, Tokyo, Japonsko; Nikon Plan Fluor 60 $\times$ ), monochromatická digitální kamera (Andor Clara, Andor Technology Ltd., Belfast, UK) a software NIS-Elements 4.12 (Laboratory Imaging, spol. s.r.o., Praha, Česká republika).

Z každého preparátu bylo z náhodně vybraných míst pořízeno 30 souborů se snímků. Každý soubor obsahoval dva typy snímků, které byly pořízeny na fluorescenčním mikroskopu pomocí dvou „kostek“ (filtr-bločků) s různými optickými filtry. Pomocí kostky s filtrovou sadou specifickou pro fluorescenci ELFA (excitace/emise: 360–370 nm/520–540 nm) byl pořízen snímek, ze kterého byla vyhodnocena buněčně specifická fluorescence ELFA. Pomocí kostky s filtry specifickými pro autofluorescenci chlorofylu (excitace/emise: 510–550 nm/ $>590$  nm) byl pořízen snímek, který nám pomohl určit pozici buňky. Každý soubor tedy obsahoval dva jednotlivé monochromatické snímky (14bit, 16 384 stupňů šedi), které byly vyhodnocovány každý zvlášť pomocí měření intenzity šedi (Znachor et al., 2013). Preparáty byly pozorovány pod zvětšením 600 $\times$ . Příklad souboru snímků je na Obr. 4.

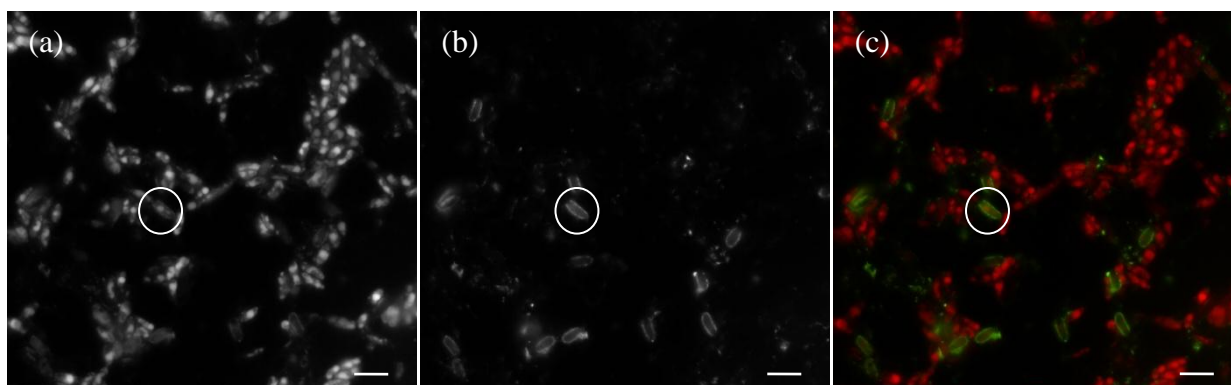
Snímky byly dále zpracovány v software NIS-Elements. Z každého souboru snímků bylo vybráno náhodně 3–6 buněk (podle hustoty buněk na filtru), celkově tedy 90–180 buněk na jeden preparát. Pomocí naprogramovaných funkcí software NIS-Elements byl pro každou měřenou buňku získán údaj o ploše buňky, průměrném stupni šedi fluorescence ELFA a průměrném stupni šedi pozadí. Data získaná ze zpracování snímků byla automaticky převedena do programu MS Excel. Specifická buněčná fluorescence ELFA ( $F^{ELFA}$ , v relativních fluorescenčních jednotkách  $FU \text{ cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) byla vypočtena podle vzorce z Nedoma et al. (2003):



$$F^{\text{ELFA}} = \text{Plocha} \times (\text{PŠ} - \text{PozPŠ}) \times F_{\text{kal}} / T_{\text{exp}}$$

Plocha ( $\mu\text{m}^2$ ).....plocha měřené buňky  
 PŠ (bezrozměrný).....průměrný stupeň šedi buňky  
 PozPŠ (bezrozměrný).....průměrný stupeň šedi pozadí  
 $F_{\text{kal}}$  (bezrozměrný).....fluorescenční kalibrační faktor  
 $T_{\text{exp}}$  (ms).....doba expozice

Buněčně specifická fosfatázová aktivita se může udávat v relativních jednotkách  $\text{FU cell}^{-1} \text{h}^{-1}$  nebo po vynásobení konverzním faktorem ( $F_k$ ) v jednotkách  $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Hodnota konverzního faktoru, použitého v této práci, byla stanovena na hodnotu  $F_k = 0,1 \text{ fmol FU}^{-1}$  (Nedoma, osobní sdělení).



**Obr. 4.** Snímky kultury *Coccomyxa* sp. z Hromnického jezírka (kultivace v médiu OM3). (a) Snímek pořízený pomocí kostky s filtrem specifickým pro autofluorescenci chlorofylu-*a*. (b) Snímek pořízený pomocí kostky s filtrem specifickým pro fluorescenci ELFA. (c) Uměle vytvořený snímek v nepravých barvách (červeně autofluorescence chlorofylu-*a*, zeleně fluorescence ELFA). Měřítka je 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4. Použité statistické metody a programy

Data byla zpracována v programu R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) a programu GraphPad Prism (verze 5.00 pro Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Jako hlavní model pro analýzu celého souboru dat (vliv koncentrace fosforu, formy fosforu, lokality a jejich kombinací na extracelulární fosfatázovou aktivitu) byla použita tzv. vícecestná ANOVA. Jako pozorování byly použity průměrné hodnoty z každé kultivační varianty (lahve). Data byla logaritmicky transformována kvůli splnění předpokladu homogenity rozptylu. Pro zjištění rozdílů mezi aktivitami v médiích s různou koncentrací fosforu byl použit *post hoc* Tukey test na párové rozdíly mezi koncentracemi. Časový průběh fosfatázové aktivity byl testován pomocí lineárního modelu. Jako prediktory byly použity délka inkubace a koncentrace fosforu v médiu a jejich interakce. Vliv délky inkubace a koncentrace fosforu v médiu a jejich interakce byly také testovány pomocí vícecestné ANOVA. Všechny analýzy byly provedeny v programu R.

Grafy zobrazující rozdíly v extracelulární fosfatázové aktivitě jednotlivých kultur v různých typech médií byly vytvořeny v programu GraphPad Prism.

## 5. Výsledky

### 5.1. Časový průběh fosfatázové aktivity *Coccomyxa* sp. při inkubaci s ELFP

Vzorky pro měření fosfatázové aktivity *Coccomyxa* sp. byly inkubovány s ELFP po dobu tří hodin a poté filtrovány. V jednom případě byl u vzorků sledován také časový průběh fosfatázové aktivity buněk v závislosti na době inkubace se ELFP. Vzorky z Hromnického jezírka a Plešného jezera v limitovaných médiích AM2 a AM3 byly filtrovány po jedné, dvou a třech hodinách a nadále byly zpracovány jako ostatní vzorky. Zaznamenaná extracelulární fosfatázová aktivita buněk je uvedena v tabulkách 2 a 3.

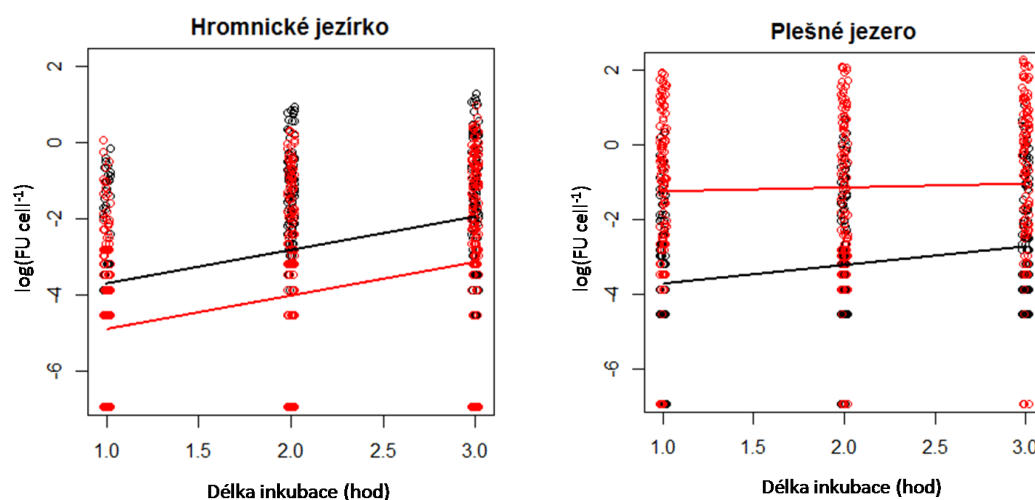
Časový průběh fosfatázové aktivity byl testován pomocí lineárního modelu (Obr. 5), jako prediktory byly použity délka inkubace a koncentrace fosforu v médiu a jejich interakce. Fosfatázová aktivita každé buňky ve vzorku tvořila jedno pozorování. Lineární model ukazuje, že u všech vzorků fosfatázová aktivita *Coccomyxa* sp. lineárně vzrůstala v závislosti na délce inkubace s ELFP. Čím déle byly buňky v kontaktu s dostupným substrátem, tím vyšší byla jejich fosfatázová aktivita. Vliv délky inkubace a koncentrace fosforu v médiu a jejich interakce byly také testovány pomocí vícecestné ANOVA. Vliv délky inkubace a koncentrace fosforu v médiu byl signifikantně významný ( $P < 0,001$ ). Interakce délky inkubace a koncentrace fosforu v médiu se neprokázala jako signifikantně významná (i když v případě Plešného jezera byla interakce na hranici významnosti,  $P < 0,031$ ). Hodnoty ze statistického zpracování jsou uvedeny v Příloze 3.

**Tabulka 2.** Časový průběh extracelulární fosfatázové aktivity při inkubaci s ELFP u vzorků z Hromnického jezírka v médiu AM2 a AM3. N – počet buněk vyhodnocených v jednom preparátu, Min – minimum, Max – maximum, SD – směrodatná odchylka. Kromě N jsou všechny hodnoty udávány v relativních jednotkách FU cell<sup>-1</sup>.

Typ média	Délka inkubace	N	Min	Max	Medián	Průměr	SD
AM2	1 hod	119	0,00	0,84	0,02	0,08	0,15
	2 hod	118	0,00	2,49	0,15	0,39	0,58
	3 hod	120	0,00	3,55	0,19	0,49	0,74
AM3	1 hod	180	0,00	1,04	0,01	0,05	0,13
	2 hod	180	0,00	1,36	0,03	0,16	0,27
	3 hod	180	0,00	2,59	0,08	0,29	0,43

**Tabulka 3.** Časový průběh extracelulární fosfatázové aktivity při inkubaci s ELFP u vzorků z Plešného jezera v médiu AM2 a AM3. N – počet buněk vyhodnocených v jednom preparátu, Min – minimum, Max – maximum, SD – směrodatná odchylka. Kromě N jsou všechny hodnoty udávány v relativních jednotkách FU cell<sup>-1</sup>.

Typ média	Délka inkubace	N	Min	Max	Medián	Průměr	SD
AM2	1 hod	120	0,00	1,40	0,02	0,09	0,21
	2 hod	119	0,00	1,95	0,03	0,15	0,31
	3 hod	120	0,00	2,87	0,04	0,25	0,45
AM3	1 hod	119	0,00	6,79	0,51	1,25	1,69
	2 hod	119	0,00	7,99	0,29	1,27	1,97
	3 hod	120	0,00	9,64	0,63	1,63	2,23



**Obr. 5.** Lineární model časového průběhu extracelulární fosfatázové aktivity při inkubaci s ELFP u vzorků z Hromnického jezírka a Plešného jezera v médiu AM2 (černě) a AM3 (červeně). Data byla logaritmicky transformována a k nulovým hodnotám byla přičtena hodnota 0,001.

## 5.2. Koncentrace SRP ve vzorcích kultur *Coccomyxa* sp.

Vybrané vzorky byly zaslány na chemickou analýzu SRP, aby byla ověřena koncentrace fosforu ve vzorcích. Vzorky byly odebrány pro srovnání v polovině doby kultivace a na konci kultivace. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4. Nejvyšší koncentrace byly podle očekávání zjištěny v nelimitovaných médiích (M1), v limitovaných kulturách M2 a M3 byly hodnoty pro každou z variant média (A a O) srovnatelné. Celkově nižší hodnoty byly charakteristické pro

varianty s organickou formou fosforu (OM). Srovnání vzorků odebraných v polovině a na konci kultivace naznačuje stabilní podmínky.

**Tabulka 4.** Chemická analýza SRP ( $\text{mg l}^{-1}$ ) v kulturách *Coccomyxa* sp. z Hromnického jezírka a Plešného jezera. 1 – odběr vzorku v polovině doby kultivace, 2 – odběr vzorku na konci doby kultivace.

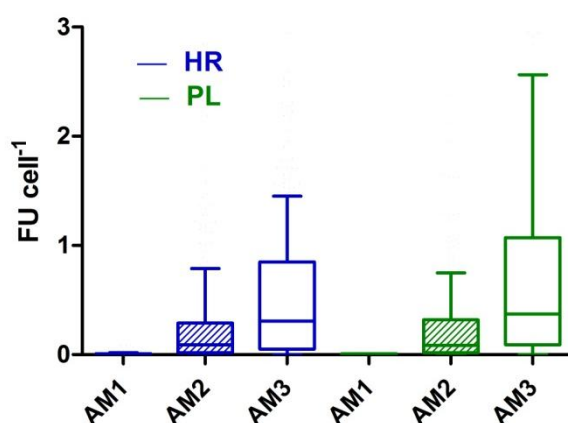
	Hromnické j.		Plešné j.	
<b>Typ média</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>AM1</b>	23,10	19,40	18,00	18,40
<b>AM2</b>	0,36	0,16	0,17	0,20
<b>AM3</b>	0,25	0,16	0,16	0,18
<b>OM1</b>	0,91	0,98	1,19	0,90
<b>OM2</b>	0,06	0,05	0,06	0,12
<b>OM3</b>	0,09	0,11	0,09	0,10

### 5.3. Závislost extracelulární fosfatázové aktivity na koncentraci a formě fosforu

Kultury zelené řasy *Coccomyxa* sp. z Hromnického jezírka (HR) a Plešného jezera (PL) byly vždy po dobu tří týdnů kultivovány v médiích s různou koncentrací fosforu. Pomocí metody FLEA, fluorescenční mikroskopie a analýzy obrazu byla ve vzorcích stanovena extracelulární fosfatázová aktivita jednotlivých buněk. Souhrnné údaje získané vyhodnocením fosfatázové aktivity u jednotlivých kultivačních variant jsou zaznamenány v tabulce 5 a rozdílly ve fosfatázové aktivitě jednotlivých kultur *Coccomyxa* sp. jsou zobrazeny pomocí grafů na Obr. 6 a 7 a pomocí vybraných snímků na Obr. 8 a 9.

#### 5.3.1. Kultivace v médiích s různou koncentrací anorganického fosforu

Kultury *Coccomyxa* sp. v médiích s různou koncentrací anorganického fosforu (AM1–AM3) se lišily ve své extracelulární fosfatázové aktivitě (Obr. 6).



**Obr. 6.** Specifická buněčná aktivita extracelulárních fosfatáz studovaných kultur *Coccomyxa* sp. v médiích s různou koncentrací anorganického fosforu (AM1–AM3). HR – Hromnické jezírko, PL – Plešné jezero. U jednotlivých variant jsou zobrazeny mediány a hodnoty v rozmezí mezi 25–75 (boxy) a 10–90 (T-úsečky) percentilem.

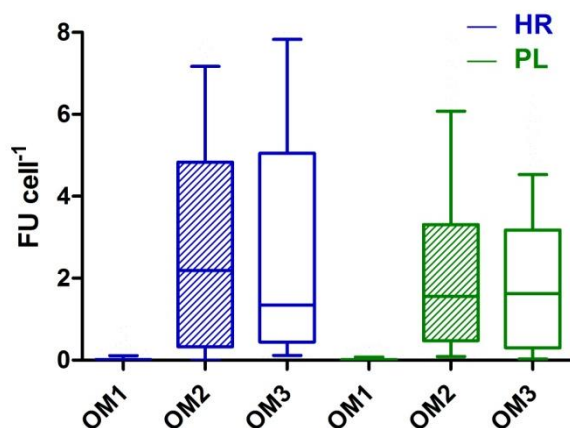
Kultury v médiu AM1 (nelimitované médium) nevykazovaly v podstatě žádnou fosfatázovou aktivitu, jelikož dostupnost fosforu byla dostatečná. V kulturách s limitovanými médii AM2 a AM3 byla prokázána fosfatázová aktivita buněk. V limitovaném médiu AM2 byla maximální fosfatázová aktivita 3,55 FU cell<sup>-1</sup> u řas z Hromnického jezírka a průměrná fosfatázová aktivita byla u řas z Hromnického jezírka také vyšší (0,29 FU cell<sup>-1</sup>). Naopak v limitovaném médiu AM3 byla maximální fosfatázová aktivita 9,64 FU cell<sup>-1</sup> u řas z Plešného jezera a také

průměrná fosfatázová aktivita byla u řas z Plešného jezera vyšší ( $0,94 \text{ FU cell}^{-1}$ , viz také tabulka 5).

Celkově tedy byla prokázána stoupající fosfatázová aktivita *Coccomyxa* sp. v závislosti na klesající dostupnosti fosforu a výsledky zároveň naznačují indukovatelnost extracelulární fosfatázové aktivity v prostředí s limitovanou dostupností fosforu.

### 5.3.2. Kultivace v médiích s různou koncentrací $\beta$ -glycerol fosfátu

Kultury *Coccomyxa* sp. v médiích s různou koncentrací  $\beta$ -glycerol fosfátu (OM1–OM3) se také lišily extracelulární fosfatázovou aktivitou (Obr. 7).



**Obr. 7.** Specifická buněčná aktivita extracelulárních fosfatáz studovaných kultur *Coccomyxa* sp. v médiích s různou koncentrací  $\beta$ -glycerol fosfátu (OM1–OM3). HR – Hromnické jezírko, PL – Plešné jezero. U jednotlivých variant jsou zobrazeny mediány a hodnoty v rozmezí mezi 25–75 (boxy) a 10–90 (T-úsečky) percentilem.

Byl prokázán významný nárůst extracelulární fosfatázové aktivity u všech kultur *Coccomyxa* sp. pěstovaných v médiu s  $\beta$ -GP oproti kulturám pěstovaným v médiích s  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , kromě kultur v médiu OM1. Kultury v médiu OM1 (nelimitované médium) vykazovaly velmi nízkou fosfatázovou aktivitu. V kulturách s limitovanými médii OM2 a OM3 byla prokázána fosfatázová aktivita buněk. Maximální fosfatázová aktivita byla naměřena v kultuře z Hromnického jezírka a médiu OM3 ( $14,37 \text{ FU cell}^{-1}$ ) a průměrná fosfatázová aktivita u řas z Hromnického jezírka v limitovaných médiích byla také vyšší ( $2,96 \text{ FU cell}^{-1}$  v OM2 a  $2,83 \text{ FU cell}^{-1}$  v OM3; viz také tabulka 5).

### **5.3.3. Celkové vyhodnocení extracelulární fosfatázové aktivity v kulturách *Coccomyxa* sp.**

Vliv koncentrace fosforu v médiu a formy fosforu na extracelulární fosfatázovou aktivitu byl signifikantní ( $P < 0,001$ ). Naopak vliv samotné lokality ani vliv interakcí koncentrace fosforu v médiu, formy fosforu a lokalit se neprokázal. Výstupy ze statistického zpracování jsou uvedeny v tabulce 6. Signifikantní rozdíly ( $P < 0,001$ ) ve fosfatázové aktivitě v kulturách *Coccomyxa* sp. byly mezi médii 1 a 2, 1 a 3. Kultury pěstované v médiích 2 a 3, se signifikantně nelišily. Testovány byly obě formy médií (anorganická i organická forma fosforu) dohromady (tabulka 7).

Důležitým zjištěním je také fakt, že buňky *Coccomyxa* sp. v rámci jednotlivých kultur nebyly jednotné ve své fosfatázové aktivitě (byla prokázána variabilita ve fosfatázové aktivitě v rámci jedné populace). Produkce extracelulárních fosfatáz tedy pravděpodobně závisí na aktuálním fyziologickém stavu či fázi životního cyklu jednotlivých buněk a buňky nejsou schopny produkovat fosfatázy v případě limitace fosforem nepřetržitě. Byl pozorován rozdíl ve velikosti buněk v různých typech kultur, buňky byly větší v kulturách s anorganickou formou fosforu (Obr. 8 a 9). Velikost buněk ovšem nebyla měřena.



**Tabulka 5.** Extracelulární fosfatázová aktivita kmenů *Coccomyxa* sp. z Hromnického jezírka a Plešného jezera v různých typech médií. N – počet buněk vyhodnocených v jednom preparátu, Min – minimum, Max – maximum, SD – směrodatná odchylka. Kromě N jsou všechny hodnoty udávány v relativních jednotkách FU cell<sup>-1</sup>.

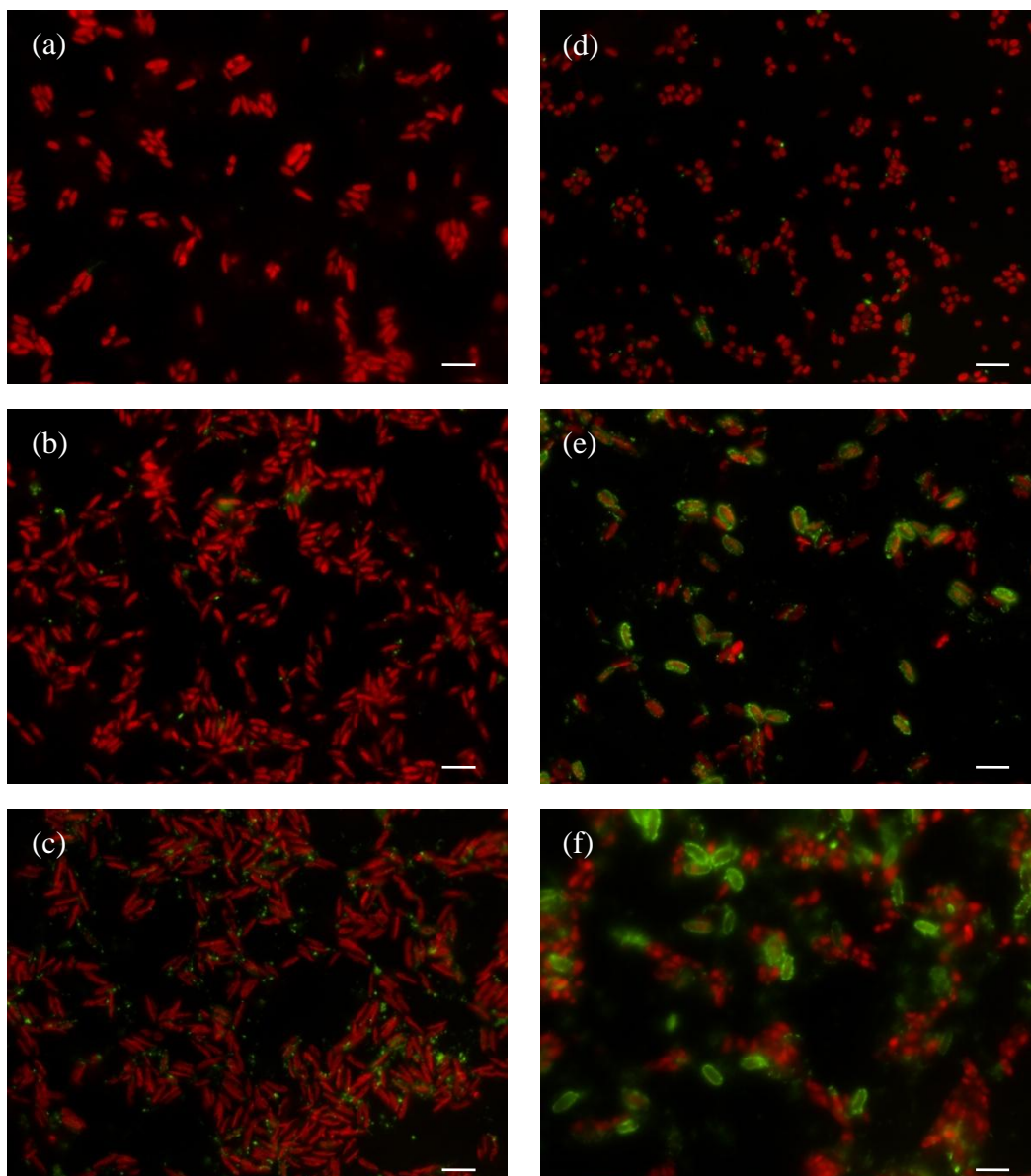
Typ média	Hromnické j.						Plešné j.					
	N	Min	Max	Medián	Průměr	SD	N	Min	Max	Medián	Průměr	SD
AM1	120	0,00	0,07	0,01	0,01	0,01	120	0,00	0,03	0,01	0,01	0,01
	90	0,00	0,08	0,00	0,00	0,01	90	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
	90	0,00	0,08	0,00	0,01	0,01	90	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
	<b>300</b>	<b>0,00</b>	<b>0,08</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>300</b>	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>
AM2	120	0,00	3,55	0,19	0,49	0,74	120	0,00	2,87	0,04	0,24	0,45
	120	0,00	3,43	0,11	0,26	0,48	120	0,00	2,79	0,08	0,21	0,38
	120	0,00	1,34	0,04	0,12	0,20	120	0,00	2,12	0,20	0,33	0,41
	<b>360</b>	<b>0,00</b>	<b>3,55</b>	<b>0,09</b>	<b>0,29</b>	<b>0,54</b>	<b>360</b>	<b>0,00</b>	<b>2,87</b>	<b>0,09</b>	<b>0,26</b>	<b>0,42</b>
AM3	180	0,00	2,59	0,08	0,29	0,43	115	0,00	9,64	0,57	1,66	2,27
	120	0,00	2,94	0,43	0,58	0,60	120	0,00	3,49	0,24	0,46	0,59
	120	0,00	4,62	0,59	0,85	0,79	120	0,00	5,47	0,51	0,75	0,98
	<b>420</b>	<b>0,00</b>	<b>4,62</b>	<b>0,31</b>	<b>0,53</b>	<b>0,64</b>	<b>355</b>	<b>0,00</b>	<b>9,64</b>	<b>0,37</b>	<b>0,94</b>	<b>1,54</b>
OM1	117	0,00	0,83	0,04	0,09	0,15	118	0,00	0,37	0,02	0,05	0,08
	120	0,00	0,27	0,00	0,01	0,04	120	0,00	0,29	0,00	0,01	0,04
	120	0,00	0,17	0,00	0,00	0,02	117	0,00	0,39	0,01	0,03	0,07
	<b>357</b>	<b>0,00</b>	<b>0,83</b>	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>	<b>0,10</b>	<b>355</b>	<b>0,00</b>	<b>0,39</b>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>	<b>0,07</b>
OM2	120	0,01	12,18	4,06	4,24	2,72	119	0,00	9,01	1,46	2,07	2,08
	120	0,00	6,21	0,12	0,80	1,37	120	0,00	9,21	1,76	2,14	1,92
	120	0,00	11,66	3,05	3,82	3,07	120	0,00	12,22	1,48	2,83	3,08
	<b>360</b>	<b>0,00</b>	<b>12,18</b>	<b>2,19</b>	<b>2,96</b>	<b>2,93</b>	<b>359</b>	<b>0,00</b>	<b>12,22</b>	<b>1,56</b>	<b>2,34</b>	<b>2,43</b>
OM3	120	0,00	14,22	2,00	3,37	3,54	120	0,00	6,15	0,55	1,12	1,31
	120	0,00	14,37	2,66	4,24	3,49	120	0,00	8,61	2,13	2,39	2,04
	120	0,00	4,93	0,68	0,88	0,77	120	0,00	8,46	2,49	2,45	1,86
	<b>360</b>	<b>0,00</b>	<b>14,37</b>	<b>1,35</b>	<b>2,83</b>	<b>3,23</b>	<b>360</b>	<b>0,00</b>	<b>8,61</b>	<b>1,62</b>	<b>1,99</b>	<b>1,86</b>

**Tabulka 6.** Výsledky statistické analýzy celého souboru dat (vícecestná ANOVA). Jako pozorování byly použity průměrné hodnoty z každé kultivační varianty (lahve). Data byla logaritmicky transformována kvůli splnění předpokladu homogenity rozptylu. L – lokalita (Hromnické jezírko nebo Plešné jezero), F – forma fosforu (A nebo O), K – koncentrace fosforu (M1 – M3), Df – stupeň volnosti, Sum Sq – součet čtverců, Mean Sq – průměrný čtverec, F – hodnota F,  $P_F$  – hodnota P.

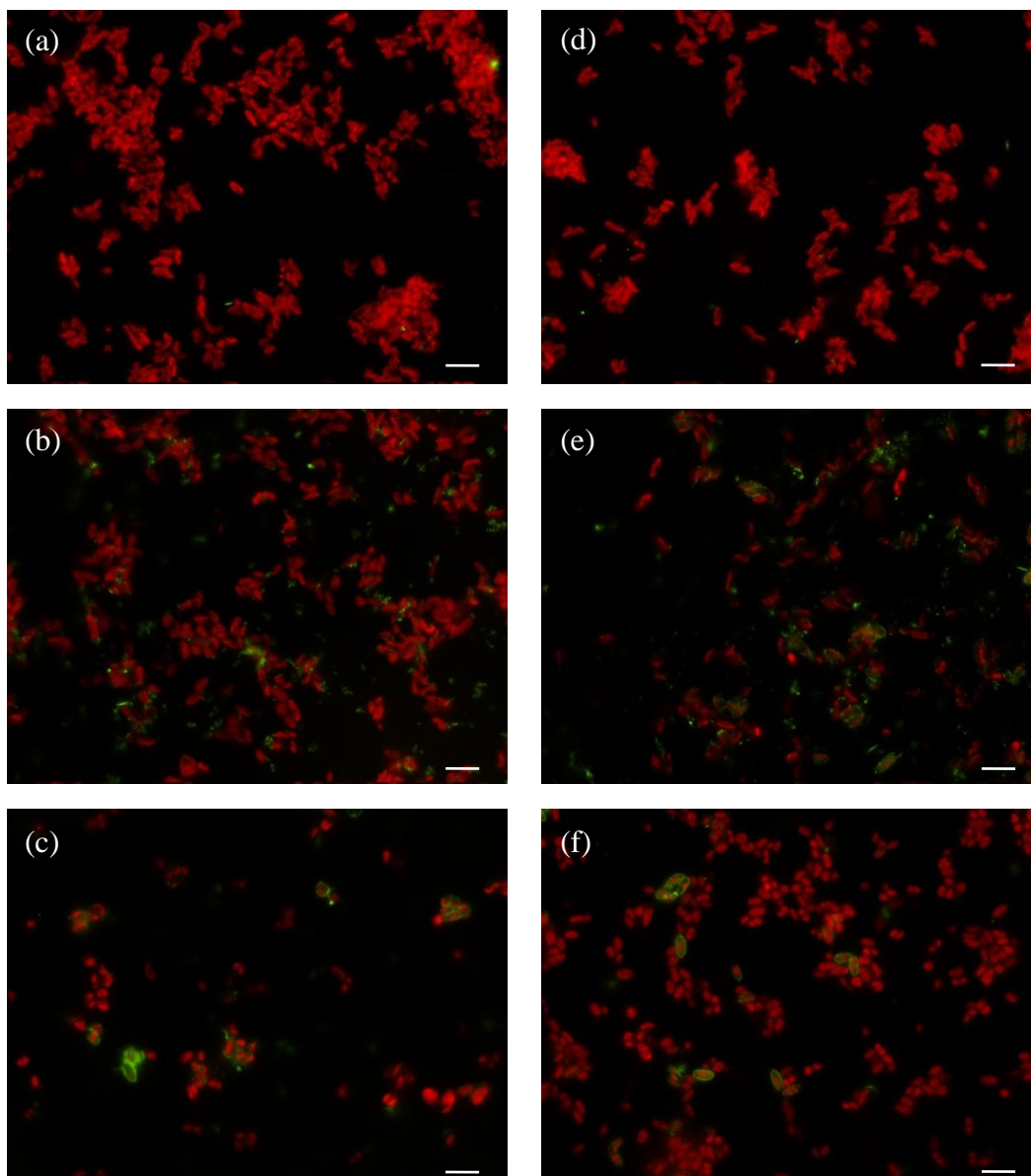
Znak	Df	Sum Sq	Mean Sq	F	$P_F$
L	1	0,001	0,001	0,0009	0,976
F	1	22,428	22,428	30,5316	<b>&lt;0.001</b>
K	2	175,419	87,71	119,403	<b>&lt;0.001</b>
L:F	1	0,15	0,15	0,2037	0,656
L:K	2	0,077	0,039	0,0526	0,949
F:K	2	1,951	0,976	1,3281	0,284
L:F:K	2	1,877	0,938	1,2773	0,297
Reziduální	24	17,63	0,735		

**Tabulka 7.** Výsledky testování na párové rozdíly mezi koncentracemi fosforu v médiích (*post hoc* Tukey test). Byly testovány obě formy médií dohromady (A i O). K – koncentrace, Diff – rozdíl průměru testovaných vzorků, Lwr–Upr – 95% interval rozdílu mezi průměry, P – hodnota P.

K	Diff	Lwr	Upr	P
2-1	4,457792	3,583998	5,331585	<b>&lt;0.001</b>
3-1	4,879078	4,005284	5,752871	<b>&lt;0.001</b>
3-2	0,421286	-0,45251	1,295079	0,462



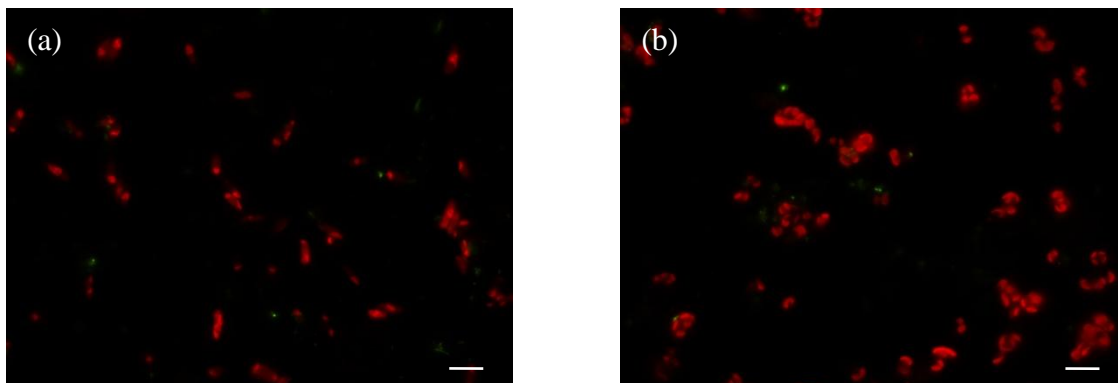
**Obr. 8.** Snímky kultur *Coccomyxa* sp. z Hromnického jezírka v nepravých barvách (červeně autofluorescence chlorofylu-*a*, zeleně fluorescence ELFA). (a) AM1, (b) AM2, (c) AM3, (d) OM1, (e) OM2, (f) OM3. Měřítka je 10  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 9.** Snímky kultur *Coccomyxa* sp. z Plešného jezera v nepravých barvách (červeně autofluorescence chlorofylu-*a*, zeleně fluorescence ELFA). (a) AM1, (b) AM2, (c) AM3, (d) OM1, (e) OM2, (f) OM3. Měřítka je 10  $\mu$ m.

#### 5.3.4. Kultivace v médiích bez fosforu

*Coccomyxa* sp. byla také pěstována v médiu bez fosforu (M0). Kultury na první pohled nevykazovaly žádnou fosfatázovou aktivitu, proto nebyly zahrnuty do měření fosfatázové aktivity pomocí analýzy obrazu a byly pouze nasnímány (Obr. 10). Tyto vzorky zároveň posloužily jako kontrola.



**Obr. 10.** Snímky kultury *Coccomyxa* sp. v nepravých barvách (červeně autofluorescence chlorofylu-*a*, zeleně fluorescence ELFA) kultivované v médiu bez fosforu (M0). V kultuře nebyla zaznamenána žádná fosfatázová aktivita. Měřítka je 10  $\mu$ m. (a) Hromnické jezírko, (b) Plešné jezero.

## 6. Diskuze

Cílem této práce bylo ověřit, zda je možné v laboratorních podmínkách indukovat extracelulární fosfatázovou aktivitu u kmenů *Coccomyxa* sp. (Chlorophyta) izolovaných z Hromnického jezírka a Plešného jezera. Byl zjištěn vliv koncentrace a formy fosforu na extracelulární fosfatázovou aktivitu, která byla kvantifikována na úrovni jednotlivých buněk. Tento typ experimentu s použitím metody FLEA nebyl na řasové kultuře *Coccomyxa* sp. ani jiných kulturách sladkovodních řas, pokud je mi známo, nikdy proveden. Práce, které se zabývaly extracelulární fosfatázovou aktivitou na úrovni jednotlivých buněk, zkoumaly převážně přírodní vzorky (případně používaly jiné substráty či kvantifikační metody; např. Nedoma et al., 2003; Štrojsová et al., 2003, 2005, 2008; Štrojsová a Vrba, 2006, 2009; Litchman a Nguyen, 2008; Novotná et al., 2010; Ou et al., 2015), takže výsledky lze s publikovanými daty srovnávat jen velmi obecně.

### 6.1. Extracelulární fosfatázová aktivita řas rodu *Coccomyxa* dominujících v planktonu Plešného jezera a Hromnického jezírka

V této práci jsem pro experimentální indukci extracelulární fosfatázové aktivity vybrala dva kmeny z rodu *Coccomyxa*, izolované ze dvou antropogenně acidifikovaných jezer. Tento rod byl teprve nedávno identifikován jako dominantní složka planktonu Plešného jezera (zde dříve uváděn jako *Monoraphidium dybowskii*; Nedbalová et al., 2006) i Hromnického jezírka (Hrdinka et al., 2013; Barcyte, 2015). Obě jezera se vyznačují kromě nízkého pH vysokými koncentracemi hliníku (v případě Hromnického jezírka i dalších toxických kovů), liší se však dostupností fosforu (Nedbalová et al., 2006; Hrdinka et al., 2013; Vrba et al., 2016).

Šumavská ledovcová jezera se liší hodnotou pH, koncentrací fosforu i hlinitých iontů. Plešné jezero se vyznačuje vyšší trofíí a unikátním oživením s relativně vysokou biomasou fytoplanktonu, která převažuje nad heterotrofní složkou. Jeho přítoky mají ze všech šumavských jezer nejvyšší koncentraci fosforu, ale především díky srážení fosforu s hlinitými hydroxidy se jeho koncentrace v epilimniu jezera výrazně snižuje (Nedbalová et al., 2006). Probíhající pomalé zotavování jezera z acidifikace se projevuje růstem celkové biomasy fytoplanktonu (Nedbalová et al., 2006; Vrba et al., 2016).

Měřením fosfatázové aktivity planktonu či specificky řas z Plešného jezera se zabývalo několik prací (Bittl et al., 2001; Nedoma et al., 2003; Štrojsová et al., 2006; Štrojsová a Vrba, 2009; Novotná et al., 2010). Fosfatázová aktivita řas v Hromnickém jezírku nebyla zatím nikdy měřena, takže získané údaje lze srovnávat pouze s hodnotami naměřenými v Plešném jezeře či podobných lokalitách. Vzhledem k vysokým koncentracím fosforu v Hromnickém jezírku však lze předpokládat, že zde řasy *in situ* aktivní nebudou (Hrdinka et al., 2013; Lin et al., 2016).

Štrojsová a Vrba (2009) porovnávali extracelulární fosfatázovou aktivitu v přehradě Římov a v Plešném jezeře. Sledovali krátkodobou změnu (v průběhu tří dnů) úhrnné fosfatázové aktivity fytoplanktonu a druhově specifické fosfatázové aktivity u zelených řas *Coccomyxa* sp. (resp. *Monoraphidium dybowskii*), *Ankyra ancora* a *Chlorogonium fusiforme*. Koncentrace SRP v epilimniu byla v přehradě Římov 0,1–0,15  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a v Plešném jezeře 0,035  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Úhrnná fosfatázová aktivita planktonu byla v Plešném jezeře řádově vyšší než v přehradě Římov, pohybovala se mezi 0,36–2,2  $\mu\text{mol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Úhrnná fosfatázová aktivita se v přehradě Římov lišila více než 400krát, ale v Plešném jezeře jen 10krát (Štrojsová a Vrba, 2009). Toto menší kolísání v Plešném jezeře může být způsobeno tím, že limitace fosforem je v Plešném jezeře v průběhu celého roku (Kopáček et al., 2004) a v přehradě Římov je sezónní (Štrojsová a Vrba, 2006).

Fosfatázová aktivita druhu *Coccomyxa* sp. (resp. *Monoraphidium dybowskii*) se pohybovala mezi 0,4–12,2  $\text{fmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , pro druh *Ankyra ancora* se hodnoty pohybovaly mezi 0–49,3  $\text{fmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a pro *Chlorogonium fusiforme* 29,8–157  $\text{fmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Štrojsová a Vrba, 2009). Srovnatelná aktivita *Coccomyxa* sp (10  $\text{fmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) ve vzorcích z Plešného jezera byla zjištěna i v práci Nedoma et al. (2003).

Maximální fosfatázová aktivita kmenů *Coccomyxa* sp. naměřená v této práci (a po vynásobení konverzním faktorem  $F_k = 0,1 \text{ fmol FU}^{-1}$ , viz kap. 4.3.2) byla 1,44  $\text{fmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$  v médiu OM3 u kultur z Hromnického jezírka a 1,22  $\text{fmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$  v médiu OM2 u kultur z Plešného jezera. Hodnoty fosfatázové aktivity v mých kulturách byly tedy nižší než ty naměřené v přírodních vzorcích (a vyhodnocené brzy po odběru vzorku na lokalitě), ovšem jsou stále srovnatelné s aktivitou z přírodních lokalit (např. Štrojsová a Vrba, 2009). Měření fosfatázové aktivity u řasových kultur poskytuje druhově specifickou informaci za kontrolovaných podmínek, ovšem v přírodním prostředí extracelulární fosfatázovou aktivitu ovlivňují další faktory a proto je nutné výsledky srovnávat a interpretovat opatrně.

Pro druh *Coccomyxa* sp. z Plešného jezera existují i informace o sezónním průběhu a vertikální stratifikaci jeho fosfatázové aktivity (Štrojsová a Vrba, 2006). V rámci studie provedené v roce 2003 bylo zjištěno, že tento druh produkuje fosfatázy po celý rok, což dokládalo trvalou limitaci fosforem. Maximální aktivity byly naměřeny v epilimniu v květnu, což je období intenzivního růstu populace (Štrojsová a Vrba, 2006).

V další studii byla fosfatázová aktivita fytoplanktonu v Plešném jezeře porovnána s dalšími šumavskými jezery (Prášilské a Čertovo) a byly studovány faktory působící na fosfatázovou aktivitu v jezerech (Novotná et al., 2010). Autoři měřili úhrnnou fosfatázovou aktivitu metodou MUFP a specifickou fosfatázovou aktivitu metodou FLEA u tří druhů obrněnek z přírodních vzorků. Průměrná úhrnná fosfatázová aktivita v Plešném jezeře byla  $8,7 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Průměrná buněčně specifická fosfatázová aktivita se mezi druhy i v rámci populace jednoho druhu lišila řádově, především kvůli různé velikosti buněk druhů v rámci jednoho jezera i mezi studovanými jezery. Úhrnná fosfatázová aktivita vzorků a další faktory ukazovaly na stoupající gradient limitace fytoplanktonu fosforem (Prášilské j. < Čertovo j. < Plešné j.), buněčně specifická fosfatázová aktivita obrněnek ukázala opačný trend. Dokonce fosfatázová aktivita buněk stoupala s rostoucí biomasou řas, což je v rozporu s publikovanými poznatky, že dominantní druhy většinou neprodukují extracelulární fosfatázy (Rengefors et al., 2001; Štrojsová et al., 2003). Tento opačný trend v produkci extracelulárních fosfatáz vzhledem k možné limitaci fytoplanktonu daného jezera fosforem by mohl být ovlivněn dalšími faktory, jako například vlivem hliníkových iontů, top-down efekty (vliv na regeneraci fosforu), různými světelnými podmínkami v jezerech a dostupností jiných zdrojů fosforu - např. bakterivorie nebo mixotrofie (Novotná et al., 2010). Na rozdíl od dříve publikovaných výsledků (Štrojsová a Vrba, 2006) byla v rámci studie Novotné et al. (2010) ve vzorcích pozorována fosfatázová aktivita dominantního druhu Plešného jezera *Coccomyxa* sp. jen velmi výjimečně, i když hodnoty SRP v epilimniu Plešného jezera zůstávaly v tomto období velmi nízké (pod detekčním limitem  $50 \text{ nmol l}^{-1}$ ). V této práci byly kultury *Coccomyxa* sp. fosfatázově aktivní i za poměrně vysoké koncentrace SRP (asi  $0,3 \text{ mg l}^{-1}$ ), což naznačuje značné zmírnění limitace fosforem v Plešném jezeře díky probíhajícímu zotavení z acidifikace (Vrba et al., 2016).

Jedním z cílů práce bylo také porovnat v experimentálních podmínkách fosfatázovou aktivitu kultur z Plešného jezera a Hromnického jezírka, které se významně liší dostupností fosforu. Výsledky prokázaly velmi podobnou dynamiku fosfatázové aktivity v podmínkách různých koncentrací i forem fosforu, což naznačuje schopnost aktivovat tuto strategii



nezávisle na předchozí historii, pokud se buňky dostanou do prostředí s nedostatkem fosforu (Lin et al., 2016).

## **6.2. Vliv koncentrace a formy fosforu na extracelulární fosfatázovou aktivitu (v přírodním prostředí i v laboratorních experimentech)**

Kmeny z rodu *Coccomyxa* v laboratorních podmínkách produkovaly extracelulární fosfatázy, hodnota fosfatázové aktivity se v průběhu experimentu mezi jednotlivými buňkami v rámci jedné populace (kultivační lahve) lišila. Produkce extracelulárních fosfatáz byla indukována sníženou dostupností fosforu v médiu. Vliv na produkci fosfatáz měla i forma dostupného fosforu. V případě, že byly řasy kultivovány v médiích s organickou formou fosforu, byla fosfatázová aktivita vyšší.

V případě limitace fosforem buňky fytoplanktonu aktivují několik adaptačních a aklimačních mechanismů, které jim usnadňují překonávat nepříznivé podmínky pro růst a rozmnožování. Využití DOP jako zdroje  $P_i$  pomocí produkce extracelulárních fosfatáz je jedním z poměrně běžných přizpůsobení. Fosfatázová aktivita je v prostředí s nedostatkem  $P_i$  stimulována, aby mohl být zásobník DOP využíván (Dyhrman et al., 2007, 2012; Lin et al., 2016). Vliv koncentrace  $P_i$  v prostředí na produkci fosfatáz dokazuje například práce Štrojsové et al. (2005), kde byly na přehradě Římov vzorky fytoplanktonu (v polopropustných vacích) z míst s malou dostupností fosforu přemístěny do míst s vyšší koncentrací fosforu a naopak. Po osmi dnech měření se ukázalo, že v místě s nízkou dostupností fosforu byly řasy o jeden řád fosfatázově aktivnější než v místě s dostatečnou koncentrací fosforu. Fosfatázová aktivita prokazatelně negativně korelovala s koncentrací SRP ( $r = -0,974$ ,  $P < 0,05$ ). V rámci dalšího experimentu v přehradě Římov, Štrojsová et al. (2008) porovnávali fosfatázovou aktivitu planktonu (bez zooplanktonu) ve dvou polopropustných vacích *in situ*. Jeden vak obsahoval vodu z přehrady a do druhého byl přidán  $P_i$  ( $K_2HPO_4$ , koncentrace P byla  $62 \mu g\ l^{-1}$ ), měření úhrnné fosfatázové aktivity (metodou MUFP), druhově specifické fosfatázové aktivity (metodou FLEA) a buněčně specifické fosfatázové aktivity *Ankyra ancora* (nejvíce zastoupený druh ve vzorku; metodou FLEA). I zde se hodnoty fosfatázové aktivity ve vaku obohaceném o  $P_i$  a kontrolním vaku signifikantně lišily ( $P = 0,0005$ ;  $0,001$ ;  $0,009$ ) a koncentrace  $P_i$  měla tedy na extracelulární fosfatázovou aktivitu vliv.

Tento předpoklad byl ověřen i v této práci, jelikož v limitovaných médiích AM2 a AM3 došlo k indukci extracelulární fosfatázové aktivity u *Coccomyxa* sp. ve všech paralelních

kultivacích a statistická analýza ukázala, že koncentrace  $P_i$  má na hodnotu fosfatázové aktivity signifikantní vliv ( $P < 0,001$ ). Fosfatázová aktivita kultur pěstovaných v médiích AM2 a AM3 se ovšem lišila jen s marginální průkazností ( $P = 0,051$ ). Pravděpodobně by bylo potřeba více opakování (více variant médií s různou koncentrací fosforu), aby byl rozdíl signifikantní. Fosfatázová aktivita byla indukována při koncentraci fosforu  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  ( $16 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ ), což je srovnatelné s hranicí koncentrace fosforu, pod kterou byly fosfatázy indukovány i u jiných zelených řas (např. *Chlorella*  $13,6 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  a *Tetraselmis*  $10,1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ ; Meseck et al., 2009).

V rámci práce Štrojsové et al. (2008) byl sledován také vliv koncentrace  $P_i$  a extracelulární fosfatázové aktivity na růst a rozmnožování buněk. Na konci experimentu byla biomasa fytoplanktonu prokazatelně vyšší ve vaku obohaceném o  $P_i$  než v kontrolním ( $P = 0,041$ ), byl zde fosfatázově aktivní menší podíl buněk. Specifická růstová rychlost fytoplanktonu byla prokazatelně vyšší ( $P = 0,029$ ) ve vaku obohaceném o  $P_i$  než v kontrolním vaku. Ve vaku obohaceném o  $P_i$  druhy nejen rostly rychleji, ale také neprodukovaly extracelulární fosfatázy nebo jich produkovaly méně. Přidáním  $P_i$  se zvyšuje růst fytoplanktonu a je inhibována extracelulární fosfatázová aktivita. V prostředí s nedostatkem  $P_i$  produkuje fytoplankton fosfatázy častěji a jejich specifická růstová rychlost je nižší. Růst je omezen z důvodu nedostatku  $P_i$  a energie je investována do syntézy fosfatáz (Štrojsová et al., 2008). Vliv na různorodost extracelulární fosfatázové aktivity by mohly mít různé růstové strategie fytoplanktonu a také to, že různé druhy pro svůj optimální růst potřebují jiné zastoupení různých prvků (Arrigo, 2005). Sklon ke zvýšené růstové rychlosti v nelimitovaném médiu a snížené růstové rychlosti na úkor extracelulární fosfatázové aktivity při snížené koncentraci fosforu nebyl v této práci ověřen. Bylo pozorováno, že buňky byly v médiích s anorganickou formou fosforu větší než v médiích s organickou formou fosforu (viz Obr. 8 a 9), ale nedošlo k jejich měření a porovnávání jejich velikosti. Tento jev je jistě zajímavým námětem k dalšímu výzkumu.

Vliv na extracelulární fosfatázovou aktivitu má také pravděpodobně fáze buněčného cyklu jednotlivých buněk, během které se mění vnitrobuněčná koncentrace a spotřeba fosforu (např. před buněčným dělením). Při nízkých koncentracích  $P_i$  je fosfatázová aktivita zvýšená, ale nedochází k dělení buněk. Je možné, že mladé dceřiné buňky, mají dostatečné zásoby fosforu a produkce fosfatáz je spuštěna v průběhu buněčného cyklu až před dalším buněčným dělením (Štrojsová et al., 2008).

Mezi populacemi různých druhů fytoplanktonu i v rámci populací jednotlivých druhů jsou fosfatázy produkovány v různém množství a lokalizace fosfatázově aktivních míst na

buňce má rozdílnou podobu. Tento trend byl pozorován v průběhu mého experimentu a ve většině dostupných pracích, které se zabývaly fosfatázovou aktivitou přírodních vzorků fytoplanktonu (Rengefors et al., 2001, 2003; Štrojsová et al., 2003, 2005; Dignum et al., 2004; Cao et al., 2005; Dyhrman a Ruttenberg, 2006). Novotná et al. (2010) pozorovali v jednom vzorku z Plešného jezera fosfatázově aktivní i neaktivní buňky, aktivní buňky se lišily jak označením ELFA, tak i intenzitou fluorescence. Tento trend byl pozorován i v kulturách *Coccomyxa* sp. v této práci. Rozdíly v extracelulární fosfatázové aktivitě mohou mít různé důvody a vznikají pravděpodobně působením mnoha faktorů. Důsledek je ten, že se jednotlivé buňky jedné populace se liší svým aktuálním fyziologickým stavem i obsahem fosforu. Některé buňky by se mohly v prostředí (a pravděpodobně i v kultuře) nacházet v malých „ostrůvcích“ bohatých na obsah potřebných prvků, což by mohlo ovlivnit dostupnost  $P_i$  i extracelulární fosfatázovou aktivitu (Graham a Wilcox, 2000; Štrojsová et al., 2003).

Vliv na extracelulární fosfatázovou aktivitu má i forma dostupného fosforu. Fytoplankton upřednostňuje asimilaci  $P_i$ , protože ho mohou buňky jednoduše přijímat a využívat ve svém metabolismu. Organické formy fosforu musí být hydrolyzovány pomocí fosfatáz na  $P_i$ , což je energeticky náročné. Nicméně v případě, že je zásobník  $P_i$  vyčerpán a organické formy fosforu představují téměř jedinou formu fosforu, růst a rozmnožování fytoplanktonu často závisí na schopnosti získat  $P_i$  touto cestou (Lin et al., 2016). Výsledky měření fosfatázové aktivity u *Coccomyxa* sp. v této práci prokázaly signifikantně vyšší aktivity v přítomnosti organické formy fosforu ( $P < 0,001$ ). Kultury v médiu OM1 (nelimitované médium) vykazovaly překvapivě velmi nízkou fosfatázovou aktivitu, což mohlo být způsobeno neenzymatickou hydrolýzou molekul  $\beta$ -GP v médiu.

Patni a Aaronson (1977) sledovali vliv formy média (anorganické, glukóza-1-fosfát a glukóza-6-fosfát) na fosfatázovou aktivitu v kultuře u řasy *Ochromonas danica* (Chrysophyceae) a pozorovali zvýšenou aktivitu v médiu s nízkou koncentrací  $P_i$  a v médiích s organickou formou fosforu. Podle nich organická forma fosforu v médiu podněcuje tvorbu fosfatáz jako mechanismu, který pomáhá řasám získávat fosfor z prostředí. V další práci Patni et al. (1977) měřili fosfatázovou aktivitu v kultuře *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). Také tento druh rostl i v médiích s organickou formou fosforu (nejlépe na ribóza-5-fosfátu) a po přidání  $P_i$  došlo k zastavení produkce fosfatáz. Ou et al. (2015) sledovali růst a průběh kompetičního vyloučení obrněnek *Prorocentrum donghaiense*, *Alexandrium catenella* a rozsivky *Skeletonema costatum* ve smíšených kulturách v médiích s anorganickou ( $KH_2PO_4$ ) a různými organickými formami fosforu (glukóza-6-fosfát, RNA, lecitin). Rozsivka dominovala v kultuře s anorganickou formou fosforu díky své vysoké

růstové schopnosti, v médiu s organickými formami fosforu dominovaly obrněnky díky své extracelulární fosfatázové aktivitě. Druhy produkující extracelulární fosfatázy tak mohou získat v prostředí limitovaném fosforem kompetiční výhodu oproti druhům, které tuto schopnost postrádají a mohou se tak stát dominantní složkou fytoplanktonu.

### **6.3. Měření extracelulární fosfatázové aktivity na úrovni jednotlivých buněk pomocí metody FLEA**

Fosfomonoesterázy jsou nejvíce studovanými enzymy ve vodním prostředí a dosud jsou jedinými enzymy, které lze měřit pomocí metody FLEA. Metoda FLEA je cenným nástrojem, který lze použít při studiu ekofyziologie a výživy jednotlivých buněk v populacích fytoplanktonu a bakterioplanktonu (Diaz-de-Quijano et al., 2014), je ale nutné při jejím použití upravit protokol podle studovaného mikroorganismu a charakteru vzorků.

Metoda FLEA se může lišit v použití fixační látky (žádná či různé fixační látky, např.  $\text{HgCl}_2$ , tekutý  $\text{N}_2$ , apod.), průběhu a způsobu inkubace vzorku (tekutý či zfiltrovaný). Všechny tyto faktory mohou mít vliv na to, zda sraženina ELFA označí pouze extracelulární fosfatázy nebo i fosfatázy v buňce (to se může stát například poškozením buněk při manipulaci se vzorkem, kdy je porušena buněčná membrána a ELFA pronikne i dovnitř buněk). Diaz-de-Quijano a Felip (2011) porovnali různé protokoly při zpracování vzorků metodou FLEA a jednou z nejlepších možností je vzorky inkubovat v tekutém stavu, poté filtrovat a nefixovat, jak bylo použito i v této práci.

Nedoma et al. (2003) rozpracovali metodu použitou v této práci, tj. jak měřit množství ELFA sraženin pomocí fluorescenční mikroskopie a 2D analýzy obrazu. Hodnoty měřené touto metodou ale mohou být zkresleny (např. díky různému tvaru a velikosti buněk) a vhodnější by bylo 3D snímání buněk. Toto 3D snímání je doporučeno pro vzorky, kde se buňky liší ve fosfatázové aktivitě méně než o jeden řád, liší se výrazně velikostí a kde je měření fosfatázové aktivity každé buňky důležitějším pozorováním než průměrná aktivita celé populace (Diaz-de-Quijano et al., 2014). V případě této práce tedy nebylo 3D snímání nutné. Navíc, případné zkreslení při 2D snímání se dá výrazně zmenšit zvýšením počtu měřených buněk (alespoň 25–40 buněk ve vzorku; Diaz-de-Quijano et al., 2014), což bylo dodrženo.

Mnoho druhů fytoplanktonu je na svém povrchu fosfatázově aktivní podle shodného vzoru (např. bodově, jen linie, po celém povrchu, atd.). Buňky *Coccomyxa* sp. v této práci byly fosfatázově aktivní převážně po celém povrchu buněk. V některých případech ovšem

mohou být fosfatázy produkované řasami zaměňovány s fosfatázami produkovanými bakteriemi, které jsou na povrchu buněk řas. Signál ELFA z bakterií na povrchu řas nebo z extracelulárních fosfatáz řas lze velmi těžko odlišit. Řešením by mohlo být přidání DAPI do vzorku a při pozorování na epifluorescenčním mikroskopu použít vhodnou sadu filtrů, abychom mohli pozorovat signál ELFA i DAPI (Nedoma a Vrba, 2006). Kdyby byla fosfatázová aktivita v této práci měřena v axenických řasových kulturách, dal by se vliv bakteriální fosfatázové aktivity na vyhodnocování fosfatázové aktivity buněk vyloučit. Ovšem řasové kultury použité v této práci axenické nebyly a nelze tedy přítomnost bakterií úplně vyloučit.

Diskutabilní je vliv  $P_i$  na zobrazení signálu ELFA a tedy na vyhodnocování fosfatázové aktivity buněk. V rámci měření sezónní fosfatázové aktivity fytoplanktonu na přehradě Římov byl proveden na jednom vzorku inhibiční experiment. Do odebraných vzorků byla přidána různá koncentrace  $P_i$  (0, 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) a byl sledován vliv inhibice  $P_i$  na rychlost hydrolýzy substrátů ELFP a MUFP oproti kontrole bez přidaného  $P_i$  (délka inkubace se substráty byla 4 hodiny). Bylo prokázáno, že  $P_i$  má silný vliv na inhibici reakce s ELFP (Štrojsová et al., 2003). Otázkou ale zůstává, jestli měl  $P_i$  vliv na inhibici reakce ELFP s fosfatázami nebo na inhibici buněčné fosfatázové aktivity.  $P_i$  je považován za inhibitor fosfatáz, protože konkuruje substrátu ve vazbě na fosfatázově aktivním místě na povrchu buňky a proto zastavuje počáteční rychlost reakce (Halemejko a Chróst, 1986; Chróst, 1991). V nelimitovaném médiu AM1 ani v médiu bez fosforu v této práci buňky nebyly fosfatázově aktivní, takže jsme mohli případnou inhibici  $P_i$  v reakci s ELFP vyloučit.

Při inkubaci s ELFP fosfatázová aktivita ve vzorcích vzrůstala lineárně, což je ideální průběh, který nastává po prodlevě na začátku reakce („lag“ fázi) běžné v tomto typu reakce. Lineární průběh reakce naznačuje ustálený průběh, kde je koncentrace meziproductů stabilní, systém je v dynamické rovnováze a rychlost hydrolýzy ELFP odpovídá rychlosti srážení ELFA. Pro to, aby byla data vzniklá vyhodnocením signálu ELFA platná, měl by být splněn tento předpoklad (Nedoma et al., 2003).

#### **6.4. Význam extracelulární fosfatázové aktivity ve sladkovodním prostředí**

Mikroorganismy, které produkují extracelulární enzymy, jsou pravděpodobně hlavními kompetitory o organické a anorganické látky ve vodním prostředí. Tím, že produkují extracelulární enzymy, mohou využít například i různé polymerické látky, které by jinak

využitelné nebyly. Extracelulární enzymy reagují s polymerickými substráty mimo buňku a katalyzují hydrolytickou přeměnu vysokomolekulárních látek na látky nízkomolekulární. Umožňují tím mikroorganismům využívat organické rozpuštěné látky, které by jinak nemohly být transportovány přes buněčné membrány. V prostředí, kde dochází k limitaci některými prvky, to tedy umožňuje vybraným mikroorganismům i nadále růst a produkovat biomasu. Díky této výhodě mohou některé druhy dominovat ekosystému. Tvoří jeho nezbytnou složku, protože ovlivňují dostupnost uhlíku, fosforu a dusíku nejen pro sebe, ale i pro ostatní organismy, které tyto enzymy neumí produkovat (Chróst, 1986, 1988, 1991; Chróst a Overbeck, 1987).

Populace řas, která je fosfatázově aktivní, by měla mít teoreticky výhodu díky zvýšenému přísunu fosforu a měla by tedy dominovat fytoplanktonu v případě nedostatku fosforu v lokalitě. Toto ale zatím nebylo spolehlivě potvrzeno, protože ani v rámci jedné populace nejsou jednotlivé buňky stejně aktivní. Produkce extracelulárních fosfatáz tedy nejspíš nezajistí kompetitivní výhodu v případě limitace fosforem. Navíc se opakovaně potvrzuje, že na tvorbu fosfatáz potřebují řasy dostatek energie, takže je například při limitaci světlem neprodukují (Novotná et al., 2010; Rychtecký et al., 2015). Je to ale pomocný mechanismus pro získávání fosforu (Rengefors et al., 2001; Štrojsová et al., 2003). Produkce extracelulárních fosfatáz ale může ovlivnit konkurenceschopnost některých druhů fytoplanktonu v podmínkách, kde dochází k limitaci fosforem a může mít zásadní dopad na jejich přizpůsobivost změnám prostředí (Štrojsová et al., 2005; Štrojsová et al., 2008). Fosfatázová aktivita je výhodná v kompetici o zdroje v situaci, kdy je koncentrace fosforu uvnitř buněk a v okolí buněk nedostatečná. Jen fosfatázově aktivní buňky jsou schopné získat  $P_i$  z DOP a pokračovat v buněčném dělení, i když jejich růstová rychlost není vysoká (Štrojsová et al., 2008). Ve sladkovodním prostředí může být navíc hydrolyza organických sloučenin obsahujících fosfor bakteriemi a fytoplanktonem hlavním zdrojem dostupného  $P_i$  (Štrojsová a Vrba, 2009). Extracelulární fosfatázová aktivita je pro rod *Coccomyxa* v Plešném jezeře a Hromnickém jezírku zřejmou výhodou. V minulosti, kdy bylo Plešné jezero více acidifikováno a limitace fosforem byla vyšší, pravděpodobně fosfatázová aktivita *Coccomyxa* sp. umožnila dominanci této řasy v jezeře. Dnes, kdy dochází k zotavení jezera z acidifikace a i koncentrace fosforu v jezeře stoupá, není tento mechanismus získávání fosforu pro *Coccomyxa* sp. natolik významný a buňky jsou méně fosfatázově aktivní (Nedbalová et al., 2006; Novotná et al., 2010; Vrba et al., 2016). Vyšší koncentrace fosforu a menší fosfatázová aktivita *Coccomyxa* sp. v Plešném jezeře souvisí pravděpodobně s reintrodukcí herbivorního druhu *Cyclops abyssorum*, jehož rostoucí populace zajišťuje vyšší regeneraci dostupných

forem fosforu v jezeře (Novotná et al., 2010). V budoucnosti by mohla být pro rod *Coccomyxa* v Plešném jezeře, ale hlavně v Hromnickém jezírku, výhodou jeho odolnost vůči toxickým účinkům některých kovů (Barcyte, 2015). Rod *Coccomyxa* není dominantní složkou planktonu v ostatních šumavských jezerech, kde je navíc koncentrace fosforu nižší než v Plešném jezeře. Dominují zde například obrněnky *Gymnodinium uberrimum* (Prášilské jezero) a *Peridinium umbonatum* (Rachelsee), které jsou také zdatné v produkci extracelulárních fosfatáz a navíc mají výhodu pohybu ve vodním sloupci. A například v jezeře Laka dominuje *Dinobryon* sp., který je schopný se živit mixotrofně (Nedbalová et al., 2006). Je tedy vidět, že extracelulární fosfatázová aktivita v prostředí limitovaném fosforem není jedinou strategií, která zajistí kompetiční výhodu oproti jiným druhům na lokalitě.

Tím, že porozumíme regulaci produkce fosfatáz, budeme moci vysvětlit mechanismy, jakými organismy reagují na změny koncentrace fosforu v prostředí. Také by bylo zajímavé zjistit, jaké formy organického fosforu mohou organismy využívat a jak se jejich inkorporací může změnit lokální chemické složení vody (Quisel et al., 1996).

## 7. Závěr

Hlavní cíl této práce byl splněn, podařilo se v laboratorních podmínkách indukovat extracelulární fosfatázovou aktivitu kmenů z rodu *Coccomyxa* izolovaných z Plešného jezera a Hromnického jezírka. Fosfatázová aktivita byla měřena na úrovni jednotlivých buněk pomocí metody FLEA, byl zjištěn vliv koncentrace a formy fosforu.

- Časový průběh fosfatázové aktivity při inkubaci vzorků *Coccomyxa* sp. se substrátem ELFP byl lineární, fosfatázová aktivita tedy rostla s časem a byl splněn předpoklad pro použití metody FLEA.
- Extracelulární fosfatázy rodu *Coccomyxa* jsou indukovatelné, buňky byly fosfatázově aktivní v obou typech médií (s anorganickým i organickým fosforem).
- Byl prokázán vliv koncentrace fosforu v médiu na extracelulární fosfatázovou aktivitu, která stoupala s klesající koncentrací fosforu v médiu. Koncentrace fosforu v prostředí má tedy na extracelulární fosfatázovou aktivitu prokazatelný vliv, především ovlivňuje obsah fosforu uvnitř buněk. Když je nedostatečný obsah fosforu v buňkách, buňky investují svou energii do produkce fosfatáz, aby byly zachovány základní buněčné děje a buňky mohly nadále růst a rozmnožovat se.
- Forma fosforu v médiu měla na fosfatázovou aktivitu také vliv. V médiu s organickou formou fosforu byla extracelulární fosfatázová aktivita vyšší, protože buňky byly nuceny štěpit fosfor z  $\beta$ -glycerol fosfátu. V případě limitace fosforem je tedy schopnost produkovat fosfatázy kompetiční výhodou, protože buňky mohou využívat i zásobník DOP a nejsou závislé pouze na přísunu anorganického fosforu.
- Při stejné koncentraci fosforu v médiu se buňky *Coccomyxa* sp. v rámci jedné populace lišily svou fosfatázovou aktivitou, v kulturách byly buňky aktivní i neaktivní. To bylo pravděpodobně způsobeno tím, že k produkci extracelulárních fosfatáz dochází jen v určité fázi buněčného cyklu. Protože experimentální kultury nebyly synchronizované, lišily se i fosfatázovou aktivitou.
- Rozdíly v extracelulární fosfatázové aktivitě u kmenů rodu *Coccomyxa* z Plešného jezera a Hromnického jezírka se neprokázaly. Oba kmeny byly podobně fosfatázově aktivní, což naznačuje schopnost aktivovat tuto strategii v prostředí s nedostatkem fosforu nezávisle na tom, odkud řasy pocházejí.



Díky schopnosti kmenů *Coccomyxa* sp. produkovat extracelulární fosfatázy, toleranci k nízkému pH a odolnosti vůči některým kovům, jsou tyto kmeny dominantní složkou fytoplanktonu v Plešném jezeře a Hromnickém jezírku. V prostředí s limitací fosforem může extracelulární fosfatázová aktivita ovlivnit konkurenceschopnost druhů a může mít zásadní dopad i na dostupnost fosforu pro ostatní organismy a v celém ekosystému. Proto je studium extracelulárních fosfatáz na úrovni jednotlivých buněk fytoplanktonu velmi zajímavým oborem, který nabízí mnoho dalších možností výzkumu.

## 8. Literatura

- AGUILERA, A.; AMARAL-ZETTLER, L.; SOUZA-EGIPSY, V.; ZETTLER, E.; AMILS, R. Eukaryotic community structure from Río Tinto (SW, Spain), a highly acidic river. In: *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, Springer Netherlands, **2007**, pp. 465–485.
- AKCIL, A.; KOLDAS, S. Acid mine drainage (AMD): causes, treatment and case studies. *Journal of Cleaner Production*, **2006**, 14: 1139–1145.
- ALBERTANO, P.; PINTO, G.; POLLIO, A.; TADDEI, R. Morphology, ultrastructure and ecology of an acidophilic alga, *Pseudococcomyxa simplex* (Mainx) Fott (Chlorococcales). *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, **1990**, 86: 81–95.
- ALLEN, H. L. Dissolved organic matter in lakewater: characteristics of molecular weight size-fractions and ecological implications. *Oikos*, **1976**, 27: 64–70.
- ALMER, B.; DICKSON, W.; EKSTRÖM, C.; HORNSTRÖM, E.; MILLER, U. Effects of acidification on Swedish lakes. *Ambio*, **1974**, 3: 30–36.
- ALMER, B.; BRODDE, W.; EKSTRÖM, C.; HÖRNSTRÖM, E. Sulfur pollution and the aquatic ecosystem. Sulfur in the environment II. *Ecological Impacts*, **1978**, 271–311.
- AMMERMAN, J. W. Microbial cycling of inorganic and organic phosphorus in the water column. In: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, **1993**, pp. 649–660.
- ARRIGO, K. R. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, **2005**, 437: 349–355.
- BARCYTE, D. Taxonomic position, phylogenetic relationships and metal resistance of green algae dominating in phytoplankton of two acid lakes. *Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova*, **2015**, pp. 106.
- BEARDALL, J.; YOUNG, E.; ROBERTS, S. Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquatic Sciences – Research Across Boundaries*, **2001**, 63: 44–69.
- BEULKER, C.; LESSMANN, D.; NIXDORF, B. Aspects of phytoplankton succession and spatial distribution in an acidic mining lake (Plessa 117, Germany). *Acta Oecologica*, **2003**, 24: 25–31.
- BISCHOFF, H. W.; BOLD, H. C. Phycological Studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *University of Texas, Austin*, **1963**, 6318: 1–95.

- BITTL, T., VRBA, J.; NEDOMA, J.; KOPÁČEK, J. Impact of ionic aluminium on extracellular phosphatases in acidified lakes. *Environmental Microbiology*, **2001**, 3: 578–587.
- BOSTRÖM, B.; PERSSON, G.; BROBERG, B. Bioavailability of different phosphorus forms in freshwater systems. *Hydrobiologia*, **1988**, 170: 133–155.
- BROBERG, O. Phosphate removal in acidified and limed lake water. *Water Research*, **1984**, 18: 1273–1278.
- CAO, X.; ŠTROJSOVÁ, A.; ZNACHOR, P.; ZAPOMĚLOVÁ, E.; LIU, G.; VRBA, J.; ZHOU, Y. Detection of extracellular phosphatases in natural spring phytoplankton of a shallow eutrophic lake (Donghu, China). *European Journal of Phycology*, **2005**, 40: 251–258.
- CAO, X.; SONG, C.; ZHOU, Y.; ŠTROJSOVÁ, A.; ZNACHOR, P.; ZAPOMĚLOVÁ, E.; VRBA, J. Extracellular phosphatases produced by phytoplankton and other sources in shallow eutrophic lakes (Wuhan, China): taxon-specific versus bulk activity. *Limnology*, **2009**, 10: 95–104.
- CLARK, L. L.; INGALL, E. D.; BENNER, R.. Marine phosphorus is selectively remineralized. *Nature*, **1998**, 393: 426.
- COTNER, J. B.; WETZEL, R. G. Bacterial phosphatases from different habitats in a small, hardwater lake. In: *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Springer New York, **1991**, pp. 187–205.
- COTNER, J. B.; WETZEL, R. G. Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus compounds by phytoplankton and bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, **1992**, 37: 232–243.
- COX, W. G.; SINGER, V. L. A high-resolution, fluorescence-based method for localization of endogenous alkaline phosphatase activity. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **1999**, 47: 1443–1455.
- DARIENKO, T.; GUSTAVS, L.; EGGERT, A.; WOLF, W.; PRÖSCHOLD, T. Evaluating the species boundaries of green microalgae (*Coccomyxa*, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. *PloS One*, **2015**, 10: e0127838.

- DIAZ-DE-QUIJANO, D. On the track of cellular ecology. Methodological improvements and contributions of single-cell phosphatase activity on the ecology of phytoplankton in Pyrenean lakes. *Doctoral thesis, University of Barcelona*, **2014**, pp. 228.
- DIAZ-DE-QUIJANO, D.; FELIP, M. A comparative study of fluorescence-labelled enzyme activity methods for assaying phosphatase activity in phytoplankton. A possible bias in the enzymatic pathway estimations. *Journal of Microbiological Methods*, **2011**, 86: 104–107.
- DIAZ-DE-QUIJANO, D.; PALACIOS, P.; HORŇÁK, K.; FELIP, M. 3D restoration microscopy improves quantification of enzyme-labeled fluorescence-based single-cell phosphatase activity in plankton. *Cytometry Part A*, **2014**, 85: 841–853.
- DIGNUM, M.; HOOGVELD, H. L.; MATTHIJS, H. C.; LAANBROEK, H. J.; PEL, R. Detecting the phosphate status of phytoplankton by enzyme-labelled fluorescence and flow cytometry. *FEMS Microbiology Ecology*, **2004**, 48: 29–38.
- DRISCOLL, C. T. Aluminum in acidic surface waters: chemistry, transport, and effects. *Environmental Health Perspectives*, **1985**, 63: 93–104.
- DRISCOLL, C. T., LAWRENCE, G. B.; BULGER, A. J.; BUTLER, T. J.; CRONAN, C. S.; EAGAR, C.; WEATHERS, K. C. Acidic deposition in the northeastern United States: sources and inputs, ecosystem effects, and management strategies. *BioScience*, **2001**, 51: 180–198.
- DUFF, S.; SARATH, G.; PLAXTON, W. C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum*, **1994**, 90: 791–800.
- DYHRMAN, S. T.; PALENIK, B. Phosphate stress in cultures and field populations of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* detected by a single-cell alkaline phosphatase assay. *Applied and Environmental Microbiology*, **1999**, 65: 3205–3212.
- DYHRMAN, S. T.; RUTTENBERG, K. C. Presence and regulation of alkaline phosphatase activity in eukaryotic phytoplankton from the coastal ocean: Implications for dissolved organic phosphorus remineralization. *Limnology and Oceanography*, **2006**, 51: 1381–1390.
- DYHRMAN, S. T.; AMMERMAN, J. W.; VAN MOOY, B. A. S.; WEBB, E. A.; ANDERSON, D. M.; MOFFETT, J. W.; WATERBURY, J. B. Cell-specific detection of phosphorus stress in *Trichodesmium* from the Western North Atlantic. *Limnology and Oceanography*, **2002**, 47: 1832–1836.

- DYHRMAN, S. T.; AMMERMAN, J. W.; VAN MOOY, B. A. S. Microbes and the marine phosphorus cycle. *Oceanography*, **2007**, 20: 110–116.
- DYHRMAN, S. T.; JENKINS, B. D.; RYNEARSON, T. A.; SAITO, M. A.; MERCIER, M. L.; ALEXANDER, H.; WU, Z. The transcriptome and proteome of the diatom *Thalassiosira pseudonana* reveal a diverse phosphorus stress response. *PloS One*, **2012**, 7: e33768.
- FEDER, J. The phosphatases. In: *Environmental Phosphorus Handbook*. J. Wiley New York, **1973**, pp. 475–508.
- FITZGERALD, G. P.; NELSON, T. C. Extractive and enzymatic analysis for limiting or surplus phosphorus in algae. *Journal of Phycology*, **1966**, 2: 32–37.
- FOTT, B. *Choricystis*, eine neue Gattung der Chlorococcales (Chlorophyceae). *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, **1976**, pp. 382–388.
- FOTT, J.; PRAŽÁKOVÁ, M.; STUHLÍK, E.; STUHLÍKOVÁ Z. Acidification of lakes in Šumava (Bohemia) and in the High Tatra Mountains (Slovakia). *Hydrobiologia*, **1994**, 274: 37–47.
- FRANCKO, D. A.; HEATH, R. T. Functionally distinct classes of complex phosphorus compounds in lake water. *Limnology and Oceanography*, **1979**, 24: 463–473.
- FRIEDL, T. Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: A phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of Phycology*, **1995**, 31: 632–639.
- GAGE, M. A.; GORHAM, E. Alkaline phosphatase activity and cellular phosphorus as an index of the phosphorus status of phytoplankton in Minnesota lakes. *Freshwater Biology*, **1985**, 15: 227–233.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, M. J.; FERNÁNDEZ, J. A.; NIELL, F. X. Photosynthetic response of P-deficient *Gracilaria tenuistipitata* under two different phosphate treatments. *Physiologia Plantarum*, **1996**, 96: 601–606.
- GELLER, A. Degradation and formation of refractory DOM by bacteria during simultaneous growth on labile substrates and persistent lake water constituents. *Aquatic Sciences-Research Across Boundaries*, **1985**, 47: 27–44.

- GELLER, W.; KLAPPER, H.; SCHULTZE, M. Natural and anthropogenic sulfuric acidification of lakes. In: *Acidic Mining Lakes*. Springer Berlin Heidelberg, **1998**. pp. 3–14.
- GELLER, W.; SCHULTZE, M.; KLEINMANN, B., WOLKERSDORFER, C. (Eds.). *Acidic pit lakes: the legacy of coal and metal surface mines*. Springer Science & Business Media, **2012**, pp. 435.
- GONZÁLEZ-GIL, S.; KEAFER, B. A.; JOVINE, R. V.; AGUILERA, A.; LU, S.; ANDERSON, D. M. Detection and quantification of alkaline phosphatase in single cells of phosphorus-starved marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, **1998**, 164: 21–35.
- GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. *Algae*. Prentice Hall, Inc., **2000**.
- GROSS, W. Ecophysiology of algae living in highly acidic environments. *Hydrobiologia*, **2000**, 433: 31–37.
- HALEMEJKO, G. Z.; CHROST, R. J. Enzymatic hydrolysis of proteinaceous particulate and dissolved material in an eutrophic lake. *Archiv für Hydrobiologie*, **1986**, 107: 1–21.
- HEALEY, F. P.; HENDZEL, L. L. Indicators of phosphorus and nitrogen deficiency in five algae in culture. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, **1979**, 36: 1364–1369.
- HEALEY, F. P.; HENDZEL, L. L. Physiological indicators of nutrient deficiency in lake phytoplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **1980**, 37: 442–453.
- HEJZLAR, J.; KOPÁČEK, J.; VRBA, J.; ČÍŽKOVÁ, R.; KOMÁRKOVÁ, J.; ŠIMEK, K. Limnological study of Plešné Lake in 1994–1995. *Silva Gabreta, Vimperk*, **1998**, 2: 155–174.
- HENDREY, G. R.; BAALSRUD, K.; TRAAEN, T. S.; LAAKE, M.; RADDUM, G. Acid precipitation: some hydrobiological changes. *Ambio*, **1976**, 5: 224–227.
- HERNÁNDEZ, I.; FERNÁNDEZ, J. A.; NIELL, F. X. Influence of phosphorus status on the seasonal variation of alkaline phosphatase activity in *Porphyra umbilicalis* (L.) Kützinger. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **1993**, 173: 181–196.
- HERNÁNDEZ, I.; HWANG, S. J.; HEATH, R. T. Measurement of phosphomonoesterase activity with a radiolabelled glucose-6-phosphate. Role in the phosphorus requirement of phytoplankton and bacterioplankton in a temperate mesotrophic lake. *Archiv für Hydrobiologie*, **1996**, 137: 265–280.

- HOPPE, H. - G. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Marine Ecology Progress Series*, **1983**, 11: 299–308.
- HRDINKA, T.; ŠOBR, M.; FOTT, J.; NEDBALOVÁ, L.. The unique environment of the most acidified permanently meromictic lake in the Czech Republic. *Limnologica*, **2013**, 43: 417–426.
- HUANG, Z.; TERPETSCHNIG, E.; YOU, W.; HAUGLAND, R. P. 2-(2'-Phosphoryloxyphenyl)-4 (3H)-quinazolinone derivatives as fluorogenic precipitating substrates of phosphatases. *Analytical Biochemistry*, **1992**, 207: 32–39.
- CHRÓST, R. J. Algal-bacterial metabolic coupling in the carbon and phosphorus cycle in lakes. *Proceedings IV ISME*, **1986**, pp. 360–366.
- CHRÓST, R. J. Phosphorus and microplankton development in an eutrophic lake. *Acta Microbiologica Polonica*, **1988**, 37: 205–225.
- CHRÓST, R. J. Characterization and significance of  $\beta$ -glucosidase activity in lake water. *Limnology and Oceanography*, **1989**, 34: 660–672.
- CHRÓST, R. J. Ectoenzymes in aquatic environments: microbial strategy for substrate supply. *Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie. Verhandlungen IVTLAP*, **1991a**, 24: 2597–2600.
- CHRÓST, R. J. Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In: *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Springer New York, **1991b**, 29–59.
- CHRÓST, R. J.; OVERBECK, J. Kinetics of alkaline phosphatase activity and phosphorus availability for phytoplankton and bacterioplankton in lake Plußsee (north German eutrophic lake). *Microbial Ecology*, **1987**, 13: 229–248.
- CHRÓST, R. J.; SIUDA, W. Ecology of microbial enzymes in lake ecosystems. In: *Enzymes in the Environment*. Marcel Dekker, Inc, **2002**, pp. 35–72.
- CHRÓST, R. J.; SIUDA, W.; HALEMEJKO, G. Z. Longterm studies on alkaline phosphatase activity (APA) in a lake with fish-aquaculture in relation to lake eutrophication and phosphorus cycle. *Archiv für Hydrobiologie*, **1984**, 70: 1–32.
- JACOBSEN, T. R.; RAI, H. Determination of aminopeptidase activity in lakewater by a short term kinetic assay and its application in two lakes of differing eutrophication. *Archiv für Hydrobiologie*, **1988**, 113: 359–370.

- JANSSON, M. Induction of high phosphatase activity by aluminum in acid lakes. *Archiv für Hydrobiologie*, **1981**, 93: 1.
- JANSSON, M.; PERSSON, G.; BROBERG, O. Phosphorus in acidified lakes: The example of Lake Gårdsjön, Sweden. *Hydrobiologia*, **1986**, 139: 81–96.
- JANSSON, M.; OLSSON, H.; PETTERSSON, K.. Phosphatases; origin, characteristics and function in lakes. In: *Phosphorus in Freshwater Ecosystems*. Springer Netherlands, **1988**. pp. 157–175.
- JOHNSON, D. B. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, **1998**, 27: 307–317.
- KOHOUT, L.; FOTT, J. Restoration of zooplankton in a small acidified mountain lake (Plešné Lake, Bohemian Forest) by reintroduction of key species. *Biologia*, **2006**, 61: 477–483.
- KOMÁREK, J.; HUBER-PESTALOZZI, G.; FOTT, B. Das Phytoplankton des Süßwassers: Systematik und Biologie. Teil 7: Hälfte 1. Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung: Chlorococcales. *Schweizerbart*, Stuttgart, **1983**.
- KOPÁČEK, J.; HEJZLAR, J.; BOROVEC, J.; PORCAL, P.; KOTOROVÁ, I. Phosphorus inactivation by aluminum in the water column and sediments: Lowering of in-lake phosphorus availability in an acidified watershed-lake ecosystem. *Limnology and Oceanography*, **2000**, 45: 212–225.
- KOPÁČEK, J.; ULRICH, K. U.; HEJZLAR, J.; BOROVEC, J.; STUHLÍK, E. Natural inactivation of phosphorus by aluminum in atmospherically acidified water bodies. *Water Research*, **2001**, 35: 3783–3790.
- KOPÁČEK, J.; BRZÁKOVÁ, M.; HEJZLAR, J.; NEDOMA, J.; PORCAL, P.; VRBA, J. Nutrient cycling in a strongly acidified mesotrophic lake. *Limnology and Oceanography*, **2004**, 49: 1202–1213.
- KOPÁČEK, J.; MAREŠOVÁ, M.; HEJZLAR, J.; NORTON, S. A. Natural inactivation of phosphorus by aluminum in preindustrial lake sediments. *Limnology and Oceanography*, **2007**, 52: 1147.
- KUENZLER, E. J.; PERRAS, J. P. Phosphatases of marine algae. *The Biological Bulletin*, **1965**, 128: 271–284.



- LAPOINTE, B. E. Phosphorus- and nitrogen-limited photosynthesis and growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) in the Florida Keys: an experimental field study. *Marine Biology*, **1987**, 93: 561–568.
- LARISON, K. D.; BREMILLER, R.; WELLS, K. S.; CLEMENTS, I.; HAUGLAND, R. P. Use of a new fluorogenic phosphatase substrate in immunohistochemical applications. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **1995**, 43: 77–83.
- LESSMANN, D.; NIXDORF, B. Acidification control of phytoplankton diversity, spatial distribution and trophic in mining lakes. *Verhandlungen, International Association of Theoretical and Applied Limnology*, **2000**, 27: 2208–2211.
- LESSMANN, D.; FYSON, A.; NIXDORF, B. Phytoplankton of the extremely acidic mining lakes of Lusatia (Germany) with  $\text{pH} \leq 3$ . *Hydrobiologia*, **2000**, 433: 123–128.
- LIN, X.; WANG, L.; SHI, X.; LIN, S. Rapidly diverging evolution of an atypical alkaline phosphatase (PhoA<sup>aty</sup>) in marine phytoplankton: insights from dinoflagellate alkaline phosphatases. *Frontiers in Microbiology*, **2015**, 6: 868.
- LIN, S.; LITAKER, R. W.; SUNDA, W. G. Phosphorus physiological ecology and molecular mechanisms in marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, **2016**, 52: 10–36.
- LITCHMAN, E.; NGUYEN, B. Alkaline phosphatase activity as a function of internal phosphorus concentration in freshwater phytoplankton. *Journal of Phycology*, **2008**, 44: 1379–1383.
- LUKEŠOVÁ, A. Soil algae in brown coal and lignite post-mining areas in central Europe (Czech Republic and Germany). *Restoration Ecology*, **2001**, 9: 341–350.
- MESECK, S. L.; ALIX, J. H.; WIKFORS, G. H.; WARD, J. E. Differences in the soluble, residual phosphate concentrations at which coastal phytoplankton species up-regulate alkaline-phosphatase expression, as measured by flow-cytometric detection of ELF-97<sup>®</sup> fluorescence. *Estuaries and Coasts*, **2009**, 32: 1195–1204.
- MÜNSTER, U. Investigations about structure, distribution and dynamics of different organic substrates in the DOM of Lake Plußsee. *Archiv für Hydrobiologie, Supplement*, **1985**, 70: 429–480.
- MÜNSTER, U.; CHRÓST, R. J. Origin, composition, and microbial utilization of dissolved organic matter. In: *Aquatic Microbial Ecology*. Springer New York, **1990**, pp. 8–46.
- NEDBALOVÁ, L.; VRTIŠKA, O. Distribution of phytoplankton of Bohemian Forest lakes. *Silva Gabreta*, **2000**, 4: 213–222.

- NEDBALOVÁ, L.; VRBA, J.; FOTT, J.; KOHOUT, L.; KOPÁČEK, J.; MACEK, M.; SOLDÁN, T. Biological recovery of the Bohemian Forest lakes from acidification. *Biologia*, **2006**, 61: 453–465.
- NEDOMA, J.; VRBA, J. Specific activity of cell-surface acid phosphatase in different bacterioplankton morphotypes in an acidified mountain lake. *Environmental Microbiology*, **2006**, 8: 1271–1279.
- NEDOMA, J.; ŠTROJSOVÁ, A.; VRBA, J.; KOMÁRKOVÁ, J.; ŠIMEK, K. Extracellular phosphatase activity of natural plankton studied with ELF97 phosphate: fluorescence quantification and labelling kinetics. *Environmental Microbiology*, **2003**, 5: 462–472.
- NEMJOVÁ, K. Molekulární fylogenetika a geometrická morfometrika aerofytických zelených rias komplexu *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* s. l. *Diplomová práce*, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, **2009**, pp. 91.
- NIXDORF, B.; WOLLMANN, K.; DENEKE, R. Ecological potentials for planktonic development and food web interactions in extremely acidic mining lakes in Lusatia. In: *Acidic Mining Lakes*. Springer Berlin Heidelberg, **1998**. pp. 147–167.
- NIXDORF, B.; FYSON, A.; KRUMBECK, H. Review: plant life in extremely acidic waters. *Environmental and Experimental Botany*, **2001**, 46: 203–211.
- NOVIS, P. M.; HARDING, J. S. Extreme acidophiles. In: *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, Springer Netherlands, **2007**, pp. 443–463.
- NOVOTNÁ, J.; NEDBALOVÁ, L.; KOPÁČEK, J.; VRBA, J. Cell-specific extracellular phosphatase activity of dinoflagellate populations in acidified mountain lakes. *Journal of Phycology*, **2010**, 46: 635–644.
- OLSSON, H.; PETTERSSON, A. Oligotrophication of acidified lakes: a review of hypotheses. *Ambio*, **1993**, 22: 312–317.
- OU, L.; HUANG, X.; HUANG, B.; QI, Y.; LU, S. Growth and competition for different forms of organic phosphorus by the dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* with the dinoflagellate *Alexandrium catenella* and the diatom *Skeletonema costatum* s. l. *Hydrobiologia*, **2015**, 754: 29–41.
- OVERBECK, J. Die Phosphatasen von *Scenedesmus quadricauda* und ihre ökologische Bedeutung. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, **1961**, 14: 226–231.

- OVERBECK, J. Untersuchungen zum Phosphathaushalt von Grünalgen. I. Phosphathaushalt und Fortpflanzungsrhythmus von *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. am natürlichen Standort. *Archiv für Hydrobiologie*, **1962**, 58: 162–209.
- OVERBECK, J. Biochemisch-ökologische Studien zum Phosphathaushalt von *Azotobacter chroococcum*. *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, **1967**, 15: 202–209.
- OVERBECK, J. Early studies on ecto-and extracellular enzymes in aquatic environments. In: *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Springer New York, **1991**, pp. 1–5.
- OVERBECK, J.; BABENZIEN, H. D. Über den Nachweis von freien Enzymen im Gewasser. *Archiv für Hydrobiologie*, **1964**, 60: 107–114.
- PARAGAS, V. B.; ZHANG, Y. Z.; HAUGLAND, R. P.; SINGER, V. L. The ELF-97 alkaline phosphatase substrate provides a bright, photostable, fluorescent signal amplification method for FISH. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **1997**, 45: 345–357.
- PATNI, N. J.; AARONSON, S. Stimulation of acid phosphatase secretion in a lower eukaryote, *Ochromonas danica*, by specific organic phosphates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, **1977**, 478: 209–214.
- PATNI, N. J.; DHAWALE, S. W.; AARONSON, S. Extracellular phosphatases of *Chlamydomonas reinhardtii* and their regulation. *Journal of Bacteriology*, **1977**, 130: 205–211.
- PETTERSSON, K. Alkaline phosphatase activity and algal surplus phosphorus as phosphorus-deficiency indicators in Lake Erken. *Archiv für Hydrobiologie*, **1980**, 89: 54–87.
- PEVELING, E.; GALUN, M. Electron-microscopical studies on the phycobiont *Coccomyxa* Schmidle. *New Phytologist*, 1976, 77: 713–718.
- PRÖSCHOLD, T.; DARIENKO, T.; SILVA, P. C.; REISSER, W., KRIENITZ, L. The systematics of *Zoochlorella* revisited employing an integrative approach. *Environmental Microbiology*, **2011**, 13: 350–364.
- QUISEL, J. D.; WYKOFF, D. D.; GROSSMAN, A. R. Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, **1996**, 111: 839–848.
- REGO, J. V.; BILLEN, G.; FONTIGNY, A.; SOMVILLE, M. Free and attached proteolytic activity in water environments. *Marine Ecology Progress Series*, **1985**, 21: 245–249.

- REICHARDT, W.; OVERBECK, J.; STEUBING, L. Free dissolved enzymes in lake waters. *Nature*, **1967**, 216: 1345–1347.
- RENGEFORS, K.; PETTERSSON, K.; BLECKNER, T.; ANDERSON, D. M. Species-specific alkaline phosphatase activity in freshwater spring phytoplankton: application of a novel method. *Journal of Plankton Research*, **2001**, 23: 435–443.
- RENGEFORS, K.; RUTTENBERG, K. C.; HAUPERT, C. L.; TAYLOR, C.; HOWES, B. L.; ANDERSON, D. M. Experimental investigation of taxon-specific response of alkaline phosphatase activity in natural freshwater phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, **2003**, 48: 1167–1175.
- RIVASSEAU, C.; FARHI, E.; ATTEIA, A.; et al. An extremely radioresistant green eukaryote for radionuclide bio-decontamination in the nuclear industry. *Energy & Environmental Science*, **2013**, 6: 1230–1239.
- RODRÍGUEZ, F.; FEIST, S. W.; GUILLOU, L.; HARKESTAD, L. S.; BATEMAN, K.; RENAULT, T.; MORTERSEN, S. H. Phylogenetic and morphological characterisation of the green algae infesting blue mussel *Mytilus edulis* in the North and South Atlantic oceans. *Diseases of Aquatic Organisms*, **2008**, 81: 231–240.
- RYCHTECKÝ, P.; ŘEHÁKOVÁ, K.; KOZLÍKOVÁ, E.; VRBA, J. Light availability may control extracellular phosphatase production in turbid environments. *Microbial Ecology*, **2015**, 69: 37–44.
- SCANLAN, D. J.; WILSON, W. H. Application of molecular techniques to addressing the role of P as a key effector in marine ecosystems. *Hydrobiologia*, **1999**, 401: 149–175.
- SCHINDLER, D. W. Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science*, **1977**, 195: 260–262.
- SCHINDLER, D. W. Effects of acid rain on freshwater ecosystems. *Science*, **1988**, 239: 149–157.
- SCHINDLER, D. W. Changes caused by acidification to the biodiversity, productivity and biogeochemical cycles of lakes. In: *Acidification of Freshwater Ecosystems: Implications for the Future*, Wiley, Chichester, **1994**, pp. 153–164.
- SCHINDLER, D. W.; HESSLEIN, R. H.; WAGEMANN, R.; BROECKER, W. S. Effects of acidification on mobilization of heavy metals and radionuclides from the sediments of a freshwater lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **1980**, 37: 373–377.

- SIUDA, W. Phosphatases and their role in organic phosphorus transformation in natural waters: A review. *Polskie Archiwum Hydrobiologii/Polish Archives of Hydrobiology*, **1984**, 31: 207–223.
- SLÁDEČKOVÁ, A. On the spontaneous growth of *Pseudococcomyxa adhaerens* (Chlorophyceae) in chemical solutions. *Ecology*, **1959**, 40: 732–733.
- STEINER, M. Zur Kenntnis des Phosphatkreislaufes in Seen. *Naturwissenschaften*, **1938**, 26: 723–724.
- SYASINA, I. G.; KUKHLEVSKY, A. D.; KOVALEVA, A. L.; VASCHENKO, M. A. Phylogenetic and morphological characterization of the green alga infesting the horse mussel *Modiolus modiolus* from Vityaz Bay (Peter the Great Bay, Sea of Japan). *Journal of Invertebrate Pathology*, **2012**, 111: 175–181.
- ŠTROJSOVÁ, A.; VRBA, J. Phytoplankton extracellular phosphatases: Investigation using the ELF (Enzyme Labelled Fluorescence) technique. *Polish Journal of Ecology*, **2006**, 54: 715–723.
- ŠTROJSOVÁ, A.; VRBA, J. Short-term variation in extracellular phosphatase activity: possible limitations for diagnosis of nutrient status in particular algal populations. *Aquatic Ecology*, **2009**, 43: 19–25.
- ŠTROJSOVÁ, A.; VRBA, J.; NEDOMA, J.; KOMÁRKOVÁ, J.; ZNACHOR, P. Seasonal study of extracellular phosphatase expression in the phytoplankton of a eutrophic reservoir. *European Journal of Phycology*, **2003**, 38: 295–306.
- ŠTROJSOVÁ, A.; VRBA, J.; NEDOMA, J.; ŠIMEK, K. Extracellular phosphatase activity of freshwater phytoplankton exposed to different in situ phosphorus concentrations. *Marine and Freshwater Research*, **2005**, 56: 417–424.
- ŠTROJSOVÁ, A.; NEDOMA, J.; ŠTROJSOVÁ, M.; CAO, X.; VRBA, J. The role of cell-surface-bound phosphatases in species competition within natural phytoplankton assemblage: an in situ experiment. *Journal of Limnology*, **2008**, 67: 128–138.
- TAYLOR, F. J. The growth of *Pseudococcomyxa adhaerens* Korshikov in distilled water. *Archiv für Mikrobiologie*, **1965**, 50: 378–381.
- THEODOROU, M. E.; ELRIFI, I. R.; TURPIN, D. H.; PLAXTON, W. C. Effects of phosphorus limitation on respiratory metabolism in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiology*, **1991**, 95: 1089–1095.

- TRÉMOUILLAUX-GUILLER, J.; HUSS, V. A. R. A cryptic intracellular green alga in *Ginkgo biloba*: ribosomal DNA markers reveal worldwide distribution. *Planta*, **2007**, 226: 553–557.
- VERMA, V.; BHATTI, S.; HUSS, V. A.; COLMAN, B. Photosynthetic inorganic carbon acquisition in an acid-tolerant, free-living species of *Coccomyxa* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, **2009**, 45: 847–854.
- VESELÝ, J. Investigations of the nature of the Šumava lakes: A review. *Časopis národního muzea, řada přírodovědná*, Praha, **1994**, 163: 103–120.
- VESELÝ, J.; HRUŠKA, J.; NORTON, S. A.; JOHNSON, C. E. Trends in water chemistry of acidified Bohemian lakes from 1984 to 1995: I. Major solutes. *Water, Air, and Soil Pollution*, **1998**, 108: 107–127.
- VINCENT, J. B.; CROWDER, M. W.; AVERILL, B. A. Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends in Biochemical Sciences*, **1992**, 17:105–110.
- VRBA, J.; KOMÁRKOVÁ, J.; VYHNÁLEK, V. Enhanced activity of alkaline phosphatases-phytoplankton response to epilimnetic phosphorus depletion. *Water Science and Technology*, **1993**, 28: 15–24.
- VRBA, J.; KOPÁČEK, J.; FOTT, J. Long-term limnological research of the Bohemian Forest lakes and their recent status. *Silva Gabreta*, **2000**, 4: 7–28.
- VRBA, J.; KOPÁČEK, J.; FOTT, J.; KOHOUT, L.; NEDBALOVÁ, L.; PRAŽÁKOVÁ, M.; SCHAUMBURG, J. Long-term studies (1871–2000) on acidification and recovery of lakes in the Bohemian Forest (central Europe). *Science of the Total Environment*, **2003**, 310: 73–85.
- VRBA, J.; BOJKOVÁ, J.; CHVOJKA, P. et al. Constraints on the biological recovery of the Bohemian Forest lakes from acid stress. *Freshwater Biology*, **2016**, 61: 376–395.
- WETZEL, R. G. Extracellular enzymatic interactions: storage, redistribution, and interspecific communication. In: *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer New York, **1991**, pp. 6–28.
- WETZEL, R. G. Limnology. *Lake and river ecosystems, 3rd edition*. Academic Press, London, **2001**.

ZNACHOR, P.; VISOCKÁ, V.; NEDOMA, J.; RYCHTECKÝ, P. Spatial heterogeneity of diatom silicification and growth in a eutrophic reservoir. *Freshwater Biology*, **2013**, 58: 1889–1902.

ZOLLER, S.; LUTZONI, F. Slow algae, fast fungi: exceptionally high nucleotide substitution rate differences between lichenized fungi *Omphalina* and their symbiotic green algae *Coccomyxa*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **2003**, 29: 629–640.

## 9. Přílohy

### Příloha 1

Kultivace *Coccomyxa* sp. v dělicích nálevkách.





## **Příloha 2**

Výpočet nahrazení anorganických fosforečných solí ( $K_2HPO_4$  a  $KH_2PO_4$ )  $\beta$ -glycerol fosfátem v 1 litru upraveného BBM média.

Látkové množství  $n(P)$  zůstává vždy stejné.

$M$ .....relativní molekulová hmotnost (bezrozměrná)

$m$ ..... hmotnost (g)

$w$ .....podíl P v molekule fosforečné soli (bezrozměrný)

$$1. \quad w(P \text{ v } K_2HPO_4) = M(P) / M(K_2HPO_4)$$

$$m(P \text{ v } K_2HPO_4) = w(P \text{ v } K_2HPO_4) \cdot m(K_2HPO_4)$$

$$2. \quad w(P \text{ v } KH_2PO_4) = M(P) / M(KH_2PO_4)$$

$$m(P \text{ v } KH_2PO_4) = w(P \text{ v } KH_2PO_4) \cdot m(KH_2PO_4)$$

$$3. \quad w(P \text{ v } \beta\text{-GP}) = M(P) / M(\beta\text{-GP})$$

$$m(\beta\text{-GP}) = [m(P \text{ v } K_2HPO_4) + m(P \text{ v } KH_2PO_4)] / w(P \text{ v } \beta\text{-GP})$$

### **Příloha 3**

Testování lineárního modelu časového průběhu extracelulární fosfatázové aktivity při inkubaci s ELFP u vzorků z Hromnického jezírka (vícecestná ANOVA). D – délka inkubace, K – koncentrace fosforu v médiu, Df – stupeň volnosti, Sum Sq – součet čtverců, Mean Sq – průměrný čtverec, F – hodnota F,  $P_F$  - hodnota P.

Znak	Df	Sum Sq	Mean Sq	F	$P_F$
<b>D</b>	1	460,1	460,14	83,4803	<b>&lt;0.001</b>
<b>K</b>	1	191,2	191,21	34,6891	<b>&lt;0.001</b>
<b>D:K</b>	1	0,2	0,15	0,0274	0,8686
Reziduální	893	4922,2	5,51		

Testování lineárního modelu časového průběhu extracelulární fosfatázové aktivity při inkubaci s ELFP u vzorků z Plešného jezera (vícecestná ANOVA). D – délka inkubace, K – koncentrace fosforu v médiu, Df – stupeň volnosti, Sum Sq – součet čtverců, Mean Sq – průměrný čtverec, F – hodnota F,  $P_F$  - hodnota P.

Znak	Df	Sum Sq	Mean Sq	F	$P_F$
<b>D</b>	1	43,56	43,56	10,998	<b>&lt;0.001</b>
<b>K</b>	1	763,47	763,47	192,7565	<b>&lt;0.001</b>
<b>D:K</b>	1	18,5	18,5	4,6705	0,031
Reziduální	713	2824,05	3,96		